

**DECANOATO DE NANDROLONA ALTERA A FUNÇÃO DO  
VENTRÍCULO ESQUERDO POR AUMENTAR A RELAÇÃO  
SERCA-2A/FOSFOLAMBAM EM RATOS SHR: EFEITOS  
PREVENIDOS PELO ENALAPRIL**

ANTONIO FERREIRA DE MELO JUNIOR

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
VITÓRIA, JUNHO DE 2017

**DECANOATO DE NANDROLONA ALTERA A FUNÇÃO DO VENTRÍCULO  
ESQUERDO POR AUMENTAR A RELAÇÃO SERCA-2A/FOSFOLAMBAM EM  
RATOS SHR: EFEITOS PREVENIDOS PELO ENALAPRIL**

**ANTONIO FERREIRA DE MELO JUNIOR**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Aprovada em \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ 2017

---

**Profa. Dra. Nazaré Souza Bissoli – Orientadora, UFES**

---

**Profa. Dra. Polyana Lima Meireles Dalpiaz- Co-orientadora, UFES**

---

**Profa. Dra. Maylla Ronacher Simões– UFES**

---

**Profa. Dra. Girlandia Brasil- UVV**

---

**Prof. Dra. Alessandra Simão Padilha**  
Coordenadora do PPGCF – UFES

Melo Junior, Antonio Ferreira 1989

Decanoato de nandrolona altera a função do ventrículo esquerdo por aumentar a relação SERCA-2a/fosfolambam em ratos SHR: efeitos prevenidos pelo enalapril [Vitória] 2017.  
74p., 29,7 cm (UFES, Msc. Ciências Fisiológicas, 2017).

Orientador: Profa. Dra. Nazaré Souza Bissoli

Co-orientador: Profa. Dra. Polyana Lima Meireles Dalpiaz

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

1. Esteroides anabólicos androgênicos 2. E Decanoato de nandrolona 3. Contratilidade cardíaca 4. Proteínas Reguladoras do Cálcio

São as nossas escolhas, mais do que nossas capacidades, que  
mostram quem realmente somos.  
Alvo Dumbledore

Dedico este trabalho aos meus pais ANTONIO FERREIRA DE MELO e LUCIMAR FERREIRA DA SILVA, que sempre foram heróis dentro de suas possibilidades.

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela sabedoria e por ser a mão forte me sustentando quando fraco.

Aos meus pais **Lucia e Antonio** por nunca terem medido esforços, por estarem sempre perto transpondo a barreira da distância com suas orações. Obrigado por fazerem de mim reflexo do que vocês são. Amo vocês incondicionalmente!

Aos meus irmãos Viviane e Rogério, meus tios Marcos, Ronaldo e Vera, Marluce e Nenzinha, meu avô Aristides por tudo que representam em minha vida.

Agradeço a Professora Nazaré Bissoli de coração por ter me recebido no LHE desde o primeiro período da graduação e por me orientar desde então. Obrigado por ser orientadora, conselheira e por confiar que eu seria capaz de realizar este trabalho. Palavras são na minha humilde opinião insuficientes para agradecer.

Agradeço de forma muito especial a minha co-orientadora Polyana Dalpiaz pelo apoio, pelo zelo e cuidado. Por estar presente nos momentos difíceis onde a pressão muitas vezes precisava ser dividida, por tirar tempo pra conversar, discutir os resultados, rir das situações e acima de tudo pela amizade que com certeza será levada nesta e outras vidas. Muito Obrigado por sempre me dizer que era possível e que eu era capaz.

Um super agradecimento aos meus instrutores Izabela Caliman, Aline Zandonadi e Phablo Oliveira pela amizade e pelo companheirismo. Por dedicarem tempo a este trabalho nos momentos em que foram acionados. Muito obrigado por fazerem parte da minha jornada desde a iniciação científica.

A minha amiga fiel Glauciene, que sempre divide comigo todos os momentos sejam bons ou ruins, seja dia ou noite. Muito obrigado por me escutar e por sempre ter uma palavra animadora. Muitas vezes estamos na mesma situação, não é mesmo?

Ao meu amigo Marcos Birocale (mais conhecido como fake), por dividir seu conhecimento e por diversas vezes alegrar as manhãs nas disciplinas que cursamos juntos.

Muito obrigado ao meu amigo, ex aluno de IC e agora mestrando Edgar Mendes, por estar presente em todos os momentos desde que chegou no laboratório. Pelos finais de semana intermináveis no biomol. Te agradeço infinitamente pelas palavras de apoio, pelas palavras positivas e por sua amizade.

Agradeço ainda minhas amigas de mestrado Laís Almeida e Polyana Peixoto, pelas conversas, gargalhadas e pelo companheirismo durante o mestrado.

Agradeço imensamente a Maylla Ronacher, por toda ajuda no western blot, por não medir esforços para me ajudar nas dúvidas, falta de material e sempre que fosse preciso. Muito obrigado!

Agradeço grandemente as Professoras Dra. Sonia Gouvea, Dra. Silvana Meyrelles e Dra. Suely Figueredo, Professor Dr. Leonardo dos Santos, Dr. Dalton Vassalo, Dr. José Geraldo Mill e Dr. Roger Lyrio, por todo conhecimento passado durante as aulas e também fora delas.

As alunas de IC Mary (agora apoio técnico), Carol, Mayara, Marília e Ana Paula por sempre se colocarem a disposição pra ajudar. O ajuda de vocês é essencial para realização de todos os projetos do laboratório.

Aos amigos do LHE, Girlandia Brasil, Andrews Nascimento, Ewelyne Lima, Karine Gadioli, Nara Rubia, Silas Ronchi, Anderson pelos bons momentos e pela contribuição de cada um para realização deste trabalho.

Meus amigos da pós Thiago Oliveira, Gersica Almeida, Paula Lopes, Elis Aguiar, Bruno Jacobsen, Filipe Filleti, Felipe Strela, Marito Silva, Simone Alves, Fabrício, Wena Marcarini, ao professor Rogério Faustino e a todos mesmo que não citados, por trazerem alegria aos nossos dias e por terem contribuído nas aulas, em dias de experimentos. Enfim, agradeço de coração.

Aos meus amigos Martielo Januário, Matheus Baião, Letícia Soprani, Felipe Soprani, Thiago, Nádia Gomes, Tainah Baião, Raul Baião, Lígia Carla, Amanda Brinco, Hebert Marques, Lara Grobério, Cláudio Host, cada um de vocês contribuiu de forma diferente para o meu crescimento como pessoa.

Aos meus antigos companheiros de graduação, mas sempre atuais amigos Maryerlen Batista, Jefferson Tavares, Izabel Luciana, Edilma Lima, Paulo Matos, por estarem sempre comigo e torcerem sempre.

Ao CNPq por conceder a bolsa que contribuiu para minha estadia diária no laboratório, permitindo a realização deste trabalho.

A todos vocês meu muito obrigado!!!!

## Sumário

1. INTRODUÇÃO .....	18
1.1 ESTERÓIDES ANABÓLICOS ANDROGÊNICOS (EAA) .....	18
1.1.1 Breve histórico sobre os EAAS .....	18
1.1.2 DECA e o Mecanismo de ação dos EAAs. ....	20
1.1.3 Prejuízos cardiovasculares associados ao uso de EAAs .....	24
1.2 ESTRUTURA DA UNIDADE FUNCIONAL DOS CARDIOMIÓCITOS E SEU MECANISMO DE CONTRAÇÃO E RELAXAMENTO .....	25
1.3 ATIVIDADE VENTRICULAR ESQUERDA .....	29
1.4 JUSTIFICATIVA .....	31
2. OBJETIVO GERAL .....	33
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	33
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	34
3.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS .....	34
3.2 RESUMO DO PROTOCOLO EXPERIMENTAL .....	34
3.3 REGISTRO DA PRESSÃO SISTÓLICA (PAS) .....	35
3.4 TRATAMENTO COM DECANOATO DE NANDROLONA .....	36
3.5 TRATAMENTO COM ENALAPRIL .....	36
3.6 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS HEMODINÂMICOS .....	37
3.7 PESO DE ÓRGÃOS E GORDURA .....	40
3.8 ANÁLISE DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT .....	40
3.9 ANÁLISES HISTÓLOGICAS .....	42
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	42
4 RESULTADOS .....	43
4.1 AVALIAÇÃO DO PESO CORPORAL INICIAL E FINAL, GORDURA EPIDIDIMAL E PRÓSTATA. ....	43
4.2 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS DO VENTRÍCULO ESQUERDO .....	44
4.3 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM DN SOBRE PARÂMETROS MORFOLÓGICOS. ....	45
4.4 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DOS TRATAMENTOS NOS PARÂMETROS HEMODINÂMICOS E CONTRATILIDADE CARDÍACA (PAS, FC, PSVE, TAU, DP/DTMAX+ E DP/DTMAX-). ....	47
4.4.1 Avaliação da pressão arterial sistólica (PAS) inicial e final .....	47
4.4.2 Avaliação da frequência cardíaca inicial e final .....	47



4.4.3 Avaliação da Pressão Sistólica Ventricular Esquerda .....	48
4.4.4 Avaliação da contratilidade do ventrículo esquerdo .....	49
4.4.5 Avaliação do relaxamento do ventrículo esquerdo .....	49
4.5 EFEITO DOS TRATAMENTOS COM DN e ENALAPRIL SOBRE A INTENSIDADE/EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA DINÂMICA DE CÁLCIO (SERCA-2A, FOSFOLAMBAM e P-FOSFOLAMBAM). ....	50
4.5.1 Avaliação da expressão proteica da SERCA-2a no ventrículo esquerdo .....	50
4.5.2 Avaliação da expressão protéica do FOSFOLAMBAM (PLB), e intensidadedo p- FOSFOLAMBAM serina 16 (p-PLB-Ser16) no ventrículo esquerdo e razão com o PLB. ....	51
5. DISCUSSÃO .....	54
5.1. EFEITO DOS TRATAMENTOS NO PESO CORPORAL, GORDURA EPIDIDIMAL E PRÓSTATA. ....	54
5.2 PARÂMETROS HISTOLÓGICOS .....	56
5.4 EFEITOS DA DECA E DO ENALAPRIL SOBRE PARÂMETROS HEMODINÂMICOS E CONTRATILIDADE CARDÍACA. ....	58
5.5 EFEITO DOS TRATAMENTOS NA INTENSIDADE/EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS SERCA2A, FOSFOLAMBAM E P-FOSFOLAMBAM(SER16), ENVOLVIDAS NA DINÂMICA DO CA <sup>2+</sup> INTRACELULAR. ....	62
6 CONCLUSÃO .....	64
7 REFERÊNCIAS .....	65

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Parâmetros biométricos dos grupos Controle, Enalapril, DECA e DECA+E.....43

**Tabela 2:** Efeito do tratamento com decanoato de nandrolona sobre o peso do ventrículo esquerdo, comprimento da tíbia, razão do peso ventrículo esquerdo/comprimento da tíbia.....44

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Estrutura química da testosterona (A), Nandrolona (B) e o processo de esterificação do grupamento 17 hidroxí que origina decanoato de nandrolona (C). Adaptado e modificado de Kicman, 2008.....	21
<b>Figura 2:</b> Mecanismos de ação dos EAA conhecidos até o momento.....	23
<b>Figura 3:</b> Homeostase de $Ca^{2+}$ e o acoplamento excitação-contração.....	28
<b>Figura 4:</b> Resumo do protocolo experimental.....	35
<b>Figura 5:</b> Posicionamento do rato em mesa cirúrgica para realização da cateterização (A) e isolamento da carótida esquerda para acesso ao VE (B).....	38
<b>Figura 6:</b> Ondas típicas sucessivas de pressão registradas dentro ventrículo esquerdo (A) e figura representativa de uma onda de pressão apontando os locais de onde foram extraídos os dados.....	40
<b>Figura 7:</b> Esquema global de uma eletroforese em gel.....	41
<b>Figura 8:</b> Análise histológica do ventrículo esquerdo para avaliação da hipertrofia.....	45
<b>Figura 9:</b> Lâminas de VE após coloração de Picrosírius Red.....	46
<b>Figura 10:</b> Representação da PAS inicial em mmHg (A) e final (B) dos grupos Controle, Enalapril, DECA, DECA+E.....	47
<b>Figura 11:</b> Valores de frequência cardíaca inicial (figura A) e final (figura B) nos grupos Controle, Enalapril, DECA, DECA+E.....	48
<b>Figura 12:</b> Medida da Pressão ventricular sistólica esquerda dos grupos Controle, Enalapril, DECA e DECA+ E.....	48
<b>Figura 13:</b> Representação do índice de contratilidade da fase de contração isovolumétrica ( $dP/dt_{max+}$ ) em mmHg/seg dos grupos Controle, Enalapril, DECA, DECA+E.....	49
<b>Figura 14:</b> Representação do índice de relaxamento da fase de contração isovolumétrica ( $dP/dt_{max-}$ ) em mmHg/seg e Constante do tempo de	

relaxamento isovolumétrico (TAU).dos grupos Controle, Enalapril, DECA e DECA+ E.....	50
--	----

<b>Figura 15:</b> Intensidade proteica da SERCA-2a no ventrículo esquerdo e razão com PLB.....	51
--	----

<b>Figura 16:</b> Intensidade proteica do PLB (figura A), p-PLB-Ser16 (figura B) e proporção da p-PLB-Ser16 no ventrículo esquerdo.....	52
---	----

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

AMPC	Adenosina Monofosfato Cíclico
AR	Receptor Androgênico
AT1	Receptor De Angiotensina 1
AT2	Receptor De Angiotensina 2
Ca <sup>2+</sup>	Cálcio
$\alpha$ -Tm	A- Tropomiosina
CT	Comprimento Da Tíbia
cTnC	Troponina C
cTnI	Troponina I
cTnT	Troponina T
DECA	Decanoato De Nandrolona
dP/dtmax +	Derivada Temporal De Pressão Máxima Positiva
dP/dtmax -	Derivada Temporal De Pressão Máxima Negativa
EAA	Esteroides Anabólicos Androgênicos
ECA	Enzima Conversora De Angiotensina
FC	Frequência Cardíaca
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
PAS	Pressão Arterial Sistólica
PKA	Proteína Quinase Dependente De Ampc
PKC	Proteína Quinase C
p-Ser16-PLB	Fosfolambam Fosforilado (Serina 16)
PSVE	Pressão Sistólica Ventricular Esquerda

PVDF	Fluoreto de polivinilideno
RS	Retículo Sarcoplasmático
RYR <sub>2</sub>	Receptores De Rianodina
SERCA-2a	Bomba De Ca <sup>2+</sup> Atpase
SHR	Ratos Espontaneamente Hipertensos
TNF- $\alpha$	Fator De Necrose Tumoral Alfa
TRF	Treinamento Físico Resistido
VE	Ventrículo Esquerdo
VE/CT	Razão Do Peso Do Ventrículo Esquerdo Pelo Comprimento Da Tíbia
WADA	Agência Mundial Antidoping

## Resumo

O uso abusivo de esteróides é uma questão preocupante especialmente os efeitos dos esteróides anabólicos androgênicos (EAA) sobre a função cardiovascular. Dados demonstram ocorrência de hipertensão arterial, cardiomiopatias, arritmias, insuficiência cardíaca e morte súbita, em função do tempo de uso. A hipertensão já acomete cerca de 27% da população brasileira e muitos destes indivíduos sequer sabem. Nos últimos anos muito se tem estudado sobre os prejuízos promovidos pelos EAA em modelos experimentais, entretanto, estes estudos se limitam a animais normotensos. Desta forma o objetivo deste trabalho foi avaliar os parâmetros de contratilidade e proteínas envolvidas na dinâmica do cálcio intracelular após tratamento por 4 semanas com Decanoato de Nandrolona em associação com Enalapril. Para tanto ratos espontaneamente hipertensos (SHR) machos com 12 semanas de idade separados em 4 grupos. Os grupos receberam os seguintes tratamentos: Água + óleo de amendoim (Controle), Enalapril 20mg/kg/dia (ENALAPRIL), Decanoato de Nandrolona 20mg/Kg (DECA) e Decanoato de Nandrolona+ Enalapril (DECA+E). Os tratamentos com água e enalapril foram realizados via gavagem e a administração de DECA ou óleo de amendoim por via intramuscular. A pressão arterial sistólica (PAS) foi avaliada de forma indireta pelo método de pletismografia de cauda. Após anestesia via intraperitoneal com quetamina Quetamina (100mg.kg<sup>-1</sup>) e Xilazina (10mg.kg<sup>-1</sup>) os animais foram submetidos a cateterização da artéria carótida direita para avaliação da função cardíaca. Os dados foram apresentados por meio da Pressão sistólica ventricular esquerda (PSVE), das derivadas temporais (dP/dtmax mmHg/seg) positiva e negativa e a Constante do tempo de relaxamento isovolumétrico TAU. O coração foi coletado para análise histológica (H&E) e deposição de colágeno (picrosírius *red*). A análise da expressão das proteínas relacionadas com a dinâmica de Ca<sup>2+</sup> citosólico foi realizada pelo método de Western blot. O tratamento com DECA não altera o peso corporal final, entretanto reduz a gordura epididimal e o enalapril foi capaz de impedir essa alteração quando associado ao DECA. Adicionalmente o DECA aumentou a razão do peso da próstata com o comprimento da tíbia e o enalapril não é capaz de impedir esse aumento. Os animais apresentaram PAS inicial semelhante, entretanto, após o término do tratamento o enalapril reduziu a PAS, o DECA aumentou esse parâmetro e no

grupo Decanoato+enalapril o aumento foi revertido. O DECA aumenta a PSVE e a derivadas positiva e negativa em relação ao controle, o enalapril isolado não altera esse parâmetro e a associação foi capaz de reverter essa alteração. O TAU é reduzido no grupo DECA e a associação com enalapril reverte parcialmente esse parâmetro. As proteínas SERCA-2a e p-PLB-Ser16, bem como a razão SERCA-2<sup>a</sup>/PLB são aumentadas nos animais DECA e o enalapril é capaz de prevenir esse aumento. Desta forma concluímos que o Decanoato de Nadrolona altera a função cardíaca e o enalapril é capaz de impedir às alterações causadas nos animais SHR, sugerindo uma importante participação do sistema renina angiotensina na promoção destas alterações.

Palavras Chave: Esteroides anabólicos androgênicos; Sistema renina angiotensina; Contratilidade cardíaca; Proteínas Reguladoras do Cálcio.



## ABSTRACT

Abuse of steroids is a matter of concern especially the effects of anabolic androgenic steroids (AAS) on cardiovascular function. Data demonstrate the occurrence of arterial hypertension, cardiomyopathies, arrhythmias, heart failure and sudden cardiac death, depending on the duration of use. Hypertension already affects about 27% of the Brazilian population and many of these people do not even know. In recent years much has been studied about the losses of AAS in experimental models, however, these studies are limited to normotensive animals. Thus, the objective of this work was to evaluate the parameters of contractility and proteins involved in the intracellular calcium dynamics after a 4-week Nandrolone Decanoate (DN) treatment, associated with Enalapril. The subjects were 12 week-old SHR males divided into 4 groups. The group of hypertensive rats was divided into the following experimental groups treated with: vehicle (Control), Enalapril 10mg/ kg/day (ENALAPRIL), Nandrolone Decanoate 10mg / kg (DN) and Enalapril + Nandrolone Decanoate (DN+E). Systolic blood pressure (PAS) was indirectly assessed by the tail plethysmography method. After receiving anesthesia via peritoneal ketamine (30mg / kg,) and xylazine (3mg / kg), the animals were submitted to catheterization of the right carotid artery to evaluate cardiac function. The data were presented by means of the Left Ventricular Systolic Pressure (LVSP), of the temporal derivatives ( $dP/dt_{max}$  mmHg/sec), positive and negative, and TAU. The heart was collected for histological analysis (H&E) and deposition of collagen (picosirius red). Analysis of the proteins expression related to cytosolic  $Ca^{2+}$  handling was performed by the Western blot method. Treatment with DN does not alter the final body weight, however it reduces epididymal fat and enalapril is able to prevent this change when associated with DN. In addition, DN increased the ratio of prostate weight to tibial length and enalapril is not able to prevent this increase. The animals presented similar initial SBP, however, after the end of the treatment enalapril reduced SBP, the DN increased this parameter and in the Decanoate + enalapril group the increase was reversed. The DECA increases the LVSP and the positive and negative derivatives in relation to the control, the enalapril alone does not alter this parameter and the association is able to reverse this alteration. TAU is reduced in the DN group and the association with enalapril partially

reverses this parameter. SERCA-2a and p-PLB-Ser16 proteins as well as the SERCA-2a / PLB ratio are increased in DN animals and enalapril is able to prevent this increase. Thus, we conclude that Nadrolone Decanoate alters cardiac function and enalapril is able to revert the changes observed in SHR animals.

Keywords: Anabolic androgenic steroids; Renin angiotensin System; Cardiac contractility; Calcium Regulatory Proteins.

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1 ESTEROIDES ANABÓLICOS ANDROGÊNICOS (EAA)**

Os efeitos cardiovasculares dos EAA, especificamente promovidos pelo decanoato de nandrolona (DECA) foram objetivos de nosso estudo, desta forma se faz necessário uma breve revisão sobre essas substâncias. Os EAAs são derivados sintéticos da testosterona e assim como a molécula precursora exercem os seus efeitos em diversos tecidos, incluindo os tecidos reprodutivos, músculos, ossos, folículos pilosos da pele, fígado, rins e os sistemas hematopoiético, imunitário e nervoso central (Mooradian et al., 1987; Hartgens; Kuipers, 2004). Os efeitos androgênicos destes hormônios podem ser considerados como aqueles associados à masculinização e os efeitos anabólicos como aqueles associados com a síntese de proteínas. Durante a puberdade, os efeitos androgênicos resultantes do aumento da esteroidogênese testicular se manifestam pelo crescimento dos testículos, genitália externa e glândulas reprodutivas masculinas acessórias (próstata, vesículas seminais e bulbouretral) e inicia-se a atividade secretora (Wilson et al., 1981).

#### **1.1.1 Breve histórico sobre os EAAS**

Até meados do século 18 o mundo desconhecia o termo anabolizante e também os efeitos destas substâncias no organismo. Entretanto, Vinold Adolph Berthold, em 1849, selecionou uma espécie de galo e realizou a retirada cirúrgica de seus testículos, observando uma redução das características masculinas que eram comuns à espécie, levando a compreensão de quão importantes são os testículos, uma vez que estes por meio, da testosterona promovem a caracterização masculina. Diversos relatos demonstram que na antiguidade, eram utilizados secreções dos órgãos sexuais para tratar impotência sexual, além do uso como substância afrodisíaca. Charles Eduard Brown, fisiologista Frances, no final do século XIX administrou em si próprio injeções de um líquido extraído dos testículos de porcos da Índia e de cães, afirmando uma elevação da sua intelectualidade e força física (David et al. 1935; Hoberman; Yesalis 1995).

Em 1935 o cientista Butenandt, ao explorar fatos históricos e relatos descobriu uma maneira de purificar a testosterona. Este foi apenas o início do avanço

desta pesquisa inovadora que culminou na sintetização da testosterona por Leopold Ruzicka e Butenandtem em 1939 (Butenandt; Hanisch 1935; Ruzicka; Wettstein 1935).

Por diversos anos pesquisadores se empenharam em modificar a estrutura da testosterona dando origem aos EAA. Desta forma a indústria farmacêutica desenvolveu diversas apresentações de EAA sintéticos com intuito de tratar doenças, podendo ser encontrados na forma de supositórios, cremes e até mesmo na forma de adesivos de fixação na pele, entretanto, os mais conhecidos são os administrados de forma injetável e oral (Grosselle, 2009).

Os EAA foram inicialmente desenvolvidos com fins terapêuticos, como exemplo, para o tratamento de pacientes com deficiência natural de andrógenos, na recuperação de cirurgias e atrofias musculares, por melhorarem o balanço de nitrogênio em estados catabólicos, prevenindo a perda de massa magra e reduzindo o aumento de tecido adiposo, também no tratamento da osteoporose, do câncer de mama e anemias, uma vez que estimulam a eritropoiese (Celotti; Cesi, 1992; Creutzberg et al, 2003; Hebert et al, 1984). Todavia desviando-se de seu uso clínico, os EAA ganharam destaque principalmente no meio esportivo, devido às suas propriedades anabólicas que promovem o aumento de massa muscular, do desenvolvimento de força, da velocidade de recuperação da musculatura e o controle dos níveis de gordura corporal melhorando o desempenho físico e atlético (Evans, 2004), sendo que a ação trófica do hormônio exógeno é mais pronunciada do que aquela observada pelos níveis normais de testosterona na circulação (Celotti; Cesi, 1992).

Embora comumente utilizada por atletas em busca de melhores desempenhos, são consideradas substâncias proibidas pela Agência Mundial Antidoping (WADA) (2010) e classificadas como *doping*. A associação de drogas no esporte é uma prática muito antiga e o desejo de superação sem respeitar limites pode ser evidenciado em diversas etapas da história da humanidade. Relatos do uso de plantas, ervas e cogumelos, com o intuito de favorecer o desempenho dos atletas também são encontrados desde as olimpíadas da Grécia Antiga, que foram iniciadas em 800 a.C. (Grivetti, Applegate, 1997). Porém, com a descoberta da testosterona em 1905 e seu isolamento em 1935, muitos produtos sintéticos começaram a ser produzidos e a busca por estes recursos

ergogênicos passou a ser evidenciada entre atletas. Relatos apontam o uso de androgênios no final da Segunda Guerra Mundial para tratar pacientes que se encontravam em situação terminal, como vítimas de traumatismo e outras situações clínicas (Czepielewski, 2002; Cunha et al, 2004).

Em 1960, os esteróides anabólicos tornaram-se conhecidos mundialmente, quando o atleta Fred Ortiz apresentou-se com uma massa muscular muito superior a seus concorrentes no campeonato de fisiculturismo (Dirix, 1988).

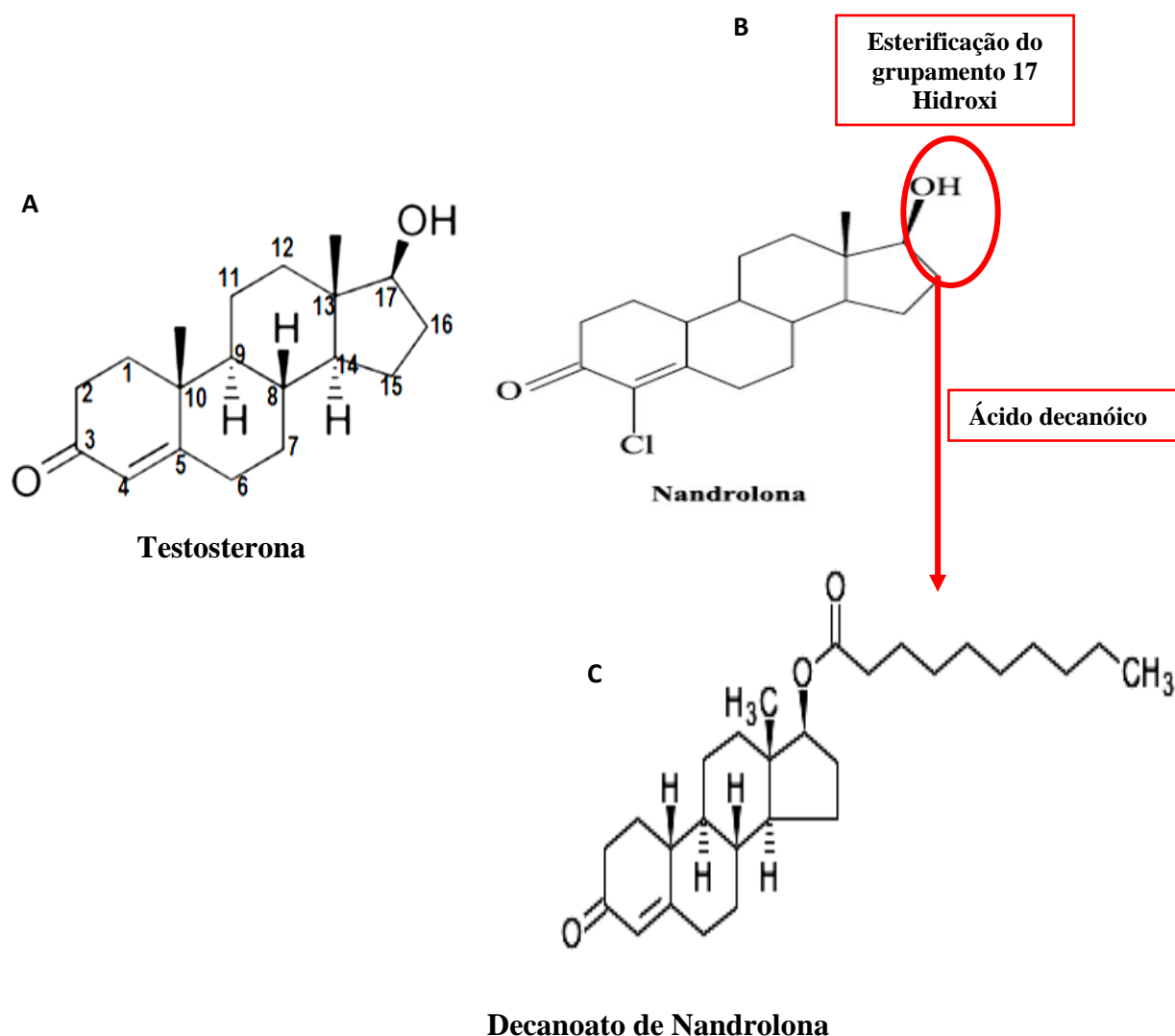
Um dos casos mais conhecidos foi o do atleta Benjamin S. Johnson, velocista jamaicano, naturalizado canadense, que em 1988 foi suspenso dos jogos Olímpicos de Seul, perdendo a sua medalha ao detectarem em sua urina a presença de estanozolol, um EAA de utilização proibida (Calfee, Fadale, 2006).

### **1.1.2 Decanoato de nandrolona e o Mecanismo de ação dos EAAs.**

A testosterona é o principal hormônio esteroide, todavia age tanto de forma anabólica quanto androgênica. Sintetizada a partir do colesterol por uma seqüência de cadeias enzimáticas dentro das células de Leydig, localizadas no interstício do testículo maduro, a testosterona é secretada durante três épocas da vida: 1) no primeiro trimestre da vida intra-uterina, transitoriamente; 2) na vida neonatal e 3) continuamente após a puberdade. O nível de testosterona produzido pode ser calculado pela depuração metabólica, pela média dos níveis de testosterona circulante, por diferença arteriovenosa testicular ou pela taxa de fluxo testicular (Knobil; Neill, 1988), e seus níveis normais de produção no homem adulto é de cerca de 4 a 9mg por dia, podendo ser aumentada pelo estímulo do exercício físico intenso. As mulheres produzem somente 0,5mg de testosterona/dia, daí a dificuldade em adquirir massa muscular (Machado; Ribeiro, 2004).

Em decorrência de seus elevados efeitos androgênicos a testosterona passou a sofrer modificações estruturais de modo a aumentar suas propriedades anabólicas e reduzir seus efeitos androgênicos (Hartgens; Kuipers, 2004). Dentre as modificações sofridas pela testosterona é importante citar a 17  $\alpha$  alquilação, onde um grupamento metil ou etil é inserido na posição C17 $\alpha$ , permitindo a utilização destes esteróides na forma oral, uma vez que estas modificações implicam numa menor metabolização pelo fígado (Shahidi, 2001).

Outra modificação importante encontrada é a esterificação do grupamento 17-hidroxi com uma longa cadeia de hidrocarbonetos, que retarda a biodegradação do EAA pelo organismo. Um produto deste tipo de modificação é o Decanoato de Nandrolona (comercialmente conhecido com Deca-Durabolin®, Organon), onde a esterificação do grupamento 17 hidroxi da nandrolona com o ácido decanóico (Figura 1) proporciona ao EAA uma ótima atividade anabólica por 6 ou 7 dias e reduzida atividade androgênica (Shahidi, 2001).



**Figura 1:** Estrutura química da testosterona (A), Nandrolona (B) e o processo de esterificação do grupamento 17 hidroxi que origina decanoato de nandrolona (C). Adaptado e modificado de Kicman, 2008.

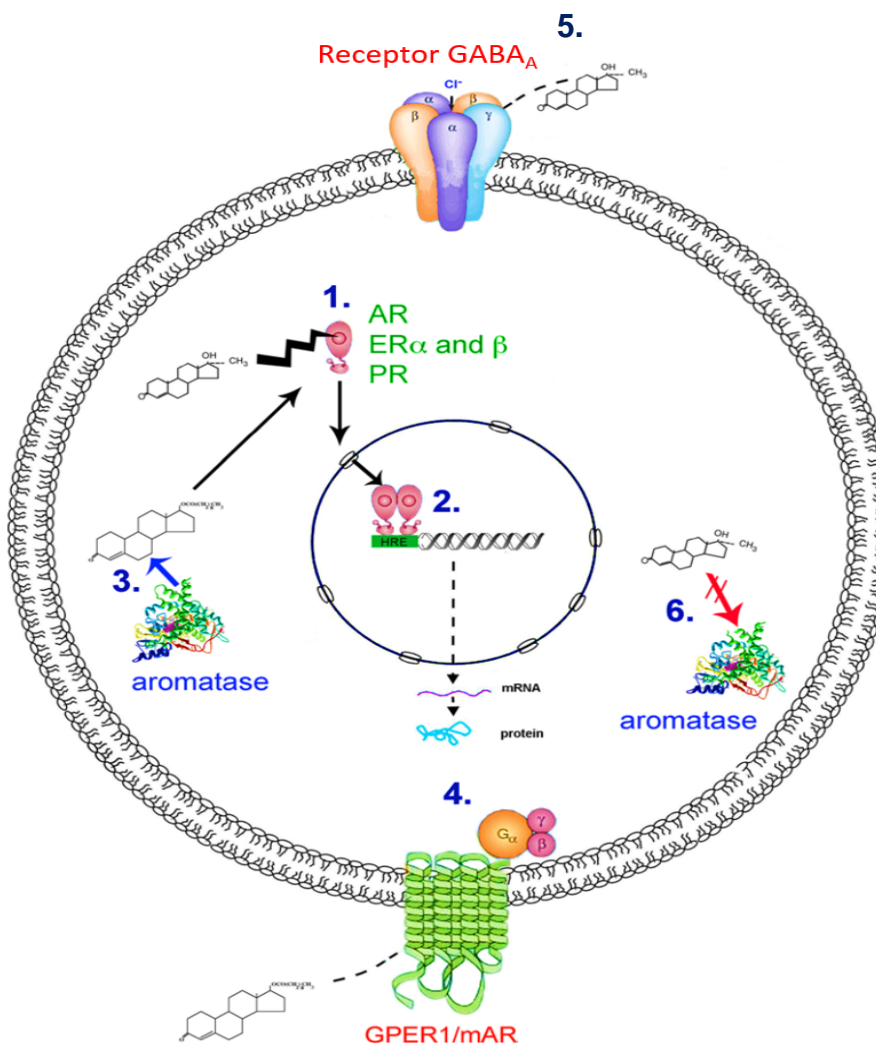
Os mecanismos de pelos quais os EAA exercem seus efeitos ainda permanecem pouco compreendidos. Basicamente por serem derivados sintéticos da testosterona, aplica-se a estes os mecanismos clássicos dos hormônios esteróides. Os EAA podem atuar diretamente em receptores específicos, sendo que quando atingem a circulação sistêmica são transportados livres ou conjugados a proteínas transportadoras, entretanto somente na forma livre pode se difundir através das membranas de células alvo e alcançar os receptores protéicos intracelulares.

Uma vez na célula alvo, ele pode sinalizar suas ações por dois mecanismos distintos, o não genômico e o genômico. A via de ação não-genômica é definida por qualquer ação mediada pela ligação hormônio-receptor não influenciando a expressão direta de genes, entretanto impulsiona efeitos mais rápidos, tais como a ativação de cascatas de sinalização. Os hormônios esteroidais ao se ligarem a receptores acoplados às proteínas G induzem uma resposta mediada por canais iônicos (ex. aumentando do cálcio intracelular) e/ou segundos mensageiros resultando em ativação de proteínas quinases como proteína quinase dependente de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) (PKA) e proteína quinase C (PKC). Estes mensageiros intracelulares atuam diretamente em proteínas efetoras, desencadeando respostas intracelulares e/ou indiretamente promovendo ação genômicas. A estimulação da proteína Gs (estimulatória), por exemplo, ativa a adenilato ciclase, catalisando a formação de AMPc, o que culmina na ativação da PKA. A PKA, por sua vez, fosforila o elemento de resposta do AMPc, que atua como fator de transcrição (Losel; Wehling 2003; Falkenstein et al. 2000).

O mecanismo genômico por sua vez, depende da passagem do EAA pela membrana plasmática, dentro do citoplasma, o EAA se liga ao receptor androgênico específico formando um complexo fármaco-receptor androgênico e migra para o núcleo celular iniciando processos de transcrição gênica e conseqüentemente a tradução de proteínas, modulando assim as ações celulares dependentes de androgênio (Figura 2) (Celotti, Cesi, 1992; Hebert et al, 1984; Shahidi, 2001).

A testosterona e os EAA podem exercer seus efeitos androgênicos e anabólicos tanto em tecidos reprodutivos quanto em tecidos não-reprodutivos. Estudos

demonstram a presença de receptores androgênicos na musculatura cardíaca e esquelética e estes apresentam as mesmas características e afinidade dos receptores presentes em tecidos somáticos (Celotti, Cesi, 1992). Entretanto, os tecidos reprodutivos apresentam um maior número de receptores em relação aos músculos e esta relação pode ser maior ou menor dependendo do músculo (Jansen et al, 1994).



**Figura 2. Mecanismos de ação dos EAA conhecidos até o momento.** Todos os EAA têm ação direta por meio da (1) ligação a receptores nucleares de androgênio (AR), bem como de estrogênio  $\alpha$  e  $\beta$  e de progesterona após ação da aromatase, promovendo a dimerização e translocação do receptor para o núcleo, e (2) regulando a expressão gênica através de interações com elementos de resposta hormonal. Alguns EAA (tais como o decanoato de nandrolona) também podem ser (3) aromatizados a estrogênios ou exercer suas atividades através de (4) mecanismos não-genômicos (incluindo ações putativas em receptores metabotrópicos acoplados à proteína G ligados a vias de sinalização segundos mensageiros). Alternativamente, EAA podem modular alostericamente o (5) *gating* de receptores (ex: GABA-A),



e a (6) inibição da aromatase (ex:metiltestosterona). Adaptado de Onakomaiya & Henderson (2016).

Muito embora diversos estudos apresentem os EAA induzindo melhor desempenho esportivo, diversos prejuízos cardiovasculares estão associados ao uso destas drogas, desta forma faremos uma revisão dos principais efeitos dos EAA no sistema cardiovascular.

### **1.1.3 Prejuízos cardiovasculares associados ao uso de EAAs**

Em decorrência do grande crescimento na busca de EAA, diversos grupos de pesquisa buscam elucidar os principais efeitos colaterais desenvolvidos pelo abuso dessas drogas principalmente no sistema cardiovascular. Os EAA parecem exercer efeitos diretos sobre coração, por meio da ação em receptores nucleares promovendo aumento do RNAm e síntese de proteínas no miocárdio (Kochakian, Yesalis, 2000; Melchert, Welder, 1995). Além disso, o uso abusivo de EAAs tem sido associado à ocorrência de hipertensão, cardiomiopatias, arritmias, insuficiência cardíaca e morte súbita cardíaca, no qual, esses efeitos adversos parecem depender da relação temporal de uso (Kennedy; Lawrence, 1993; Sullivan et al., 1998; Fineschi et al., 2001; Liu et al., 2003). Complicações como infarto agudo do miocárdio e aterosclerose também podem ocorrer devido a alterações no metabolismo de lipoproteínas e disfunção endotelial (Caliman et al, 2017; Hartgens et al, 2004; Kuipers et al, 1991).

Além dos efeitos diretos no músculo cardíaco Ammar et al (2004) e Ebenbichler et al (2010), buscaram avaliar os efeitos dos EAA na função vascular e observaram que a produção de substâncias vasodilatadoras pelo endotélio pode estar prejudicada. Corroborando estes dados e elucidando melhor o prejuízo causado no relaxamento vascular, os resultados do estudo de Caliman et al, 2017 demonstram ocorrer redução da produção de óxido nítrico via enzima óxido nítrico sintase em ratas wistar tratadas com doses suprafisiológicas de DECA.

Além dos prejuízos cardiovasculares acima citados, estudos realizados com ratos wistar demonstraram a influência do uso crônico de doses suprafisiológicas de Decanoato de Nandrolona em ratos sedentários na sensibilidade do reflexo cardiopulmonar Bezold-Jarisch. Verificou-se que o prejuízo do reflexo Bezold-Jarisch é tempo dependente (Andrade et al., 2008; Bissoli et al., 2009) e que, a

hipertrofia cardíaca encontrada nesses animais cursa com o aumento da deposição de colágeno na matriz extracelular (Andrade et al., 2008; Bissoli et al., 2009), e que o aumento da pressão arterial e o prejuízo do reflexo Bezold-Jarisch (Bissoli et al., 2009) são prevenidos quando esses animais são tratados com inibidor da enzima conversora de angiotensina concomitante ao uso de DECA (Andrade et al., 2007).

A ECA é uma ectoenzima, metalopeptidase, que encontra-se ancorada a membrana plasmática e está amplamente distribuída pelo organismo sendo encontrada tanto nos fluidos corporais quanto nos tecidos como: células endoteliais, miócitos cardíacos, trato gastrointestinal, testículo, próstata entre outros (Dzau; Burt; Pratt, 1988; Sanjuliani et al, 2011). A principal função da ECA na circulação é gerar Ang II e degradar a bradicinina, como a angiotensina II (Ang II) é um importante regulador do equilíbrio hidroeletrolítico, crescimento celular e remodelamento cardiovascular, age como um ponto focal na integração de processos complexos que ajudam a manter a pressão sanguínea e a perfusão de órgãos vitais. Os efeitos da Ang II sobre o organismo são mediados por receptores de membrana específicos, o receptor de angiotensina do subtipo 1 (AT1) e o receptor de angiotensina do subtipo 2 (AT2R), que assim como a ECA estão amplamente distribuídos em vários tecidos (Costerousse et al, 1992; Rivière et al, 2005).

Estudos em animais utilizando EAA em doses elevadas sugerem que a insuficiência cardíaca, bem como outras alterações no coração podem estar relacionados ao surgimento de fibrose, deposição de colágeno intersticial, hipertrofia (Franquini et al. 2013) e apoptose de cardiomiócitos (Hassan & Kamal 2013), aumento da atividade do sistema renina-angiotensina, aumento do tônus autonômico simpático e da expressão de receptores  $\beta$ -adrenérgicos, remodelamento elétrico do tecido cardíaco (aumento de corrente de cálcio tipo L e redução de corrente transiente de saída de potássio) (Medei et al. 2010), aumento da contratilidade cardíaca em ratas wistar tratadas com decanoato de nandrolona 20mg/kg e alterações nas proteínas relacionadas a dinâmica de Cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (Nascimento et al. 2016).

Diante do exposto acima, demonstrando que os EAA promovem alterações na contratilidade cardíaca por mecanismos relacionados à estimulação simpática e

a dinâmica do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, desta forma a seguir faremos uma revisão sobre a estrutura dos cardiomiócitos e o mecanismo de contração dos destes.

## 1.2 ESTRUTURA DA UNIDADE FUNCIONAL DOS CARDIOMIÓCITOS E SEU MECANISMO DE CONTRAÇÃO E RELAXAMENTO

Os cardiomiócitos são constituídos em sua maioria por unidades funcionais denominadas sarcômeros, totalizando cerca de 50% da massa celular. Estes são organizados de forma continua na célula e com alinhamento perfeito das unidades repetidas de modo a garantir o processo contrátil. Estas unidades são constituídas por miofibrilas organizadas de forma longitudinal ao longo do citoplasma, compostas por proteínas contráteis, estruturais e regulatórias (Katz, 1970; Kobayashi; Solaro, 2005).

As proteínas contráteis presentes no sarcômero são distintas e classificadas em miofilamentos grossos, formados pela miosina e os filamentos finos, formados por actina, troponina I (cTnI), troponina T (cTnT), troponina C (cTnC) e  $\alpha$ -tropomiosina ( $\alpha$ -Tm). Outra importante proteína sarcomérica é a titina, a qual fornece elasticidade às unidades contráteis, colocando-se desde a linha Z até a linha M (Morimoto, 2008; Maughan, 2005). A actina apresenta sítios ativos que interagem com a miosina. Esta interação produz um encurtamento dos sarcômeros e consequentemente do músculo cardíaco gerando a contração que é o resultado final de uma seqüência de eventos desencadeados pelo estímulo elétrico que gera o potencial de ação cardíaco. Atribui-se a este processo o nome de acoplamento excitação-contração (Lizardo, 2008).

A capacidade do miócito de gerar potenciais de ação é decorrente das alterações na permeabilidade da membrana sarcolemal aos íons sódio, potássio, cloreto e cálcio que ocorrem devido a modificações na voltagem celular. Desta forma, o potencial de ação do músculo cardíaco inicia-se com a excitação do sarcolema que promove a abertura de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependente de voltagem do tipo-L, por meio dos quais, uma pequena quantidade de íons entra na célula. No início da contração do miocárdio, o  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático se liga aos receptores de rianodina do retículo sarcoplasmático ( $\text{RYR}_2$ ), culminando na liberação de

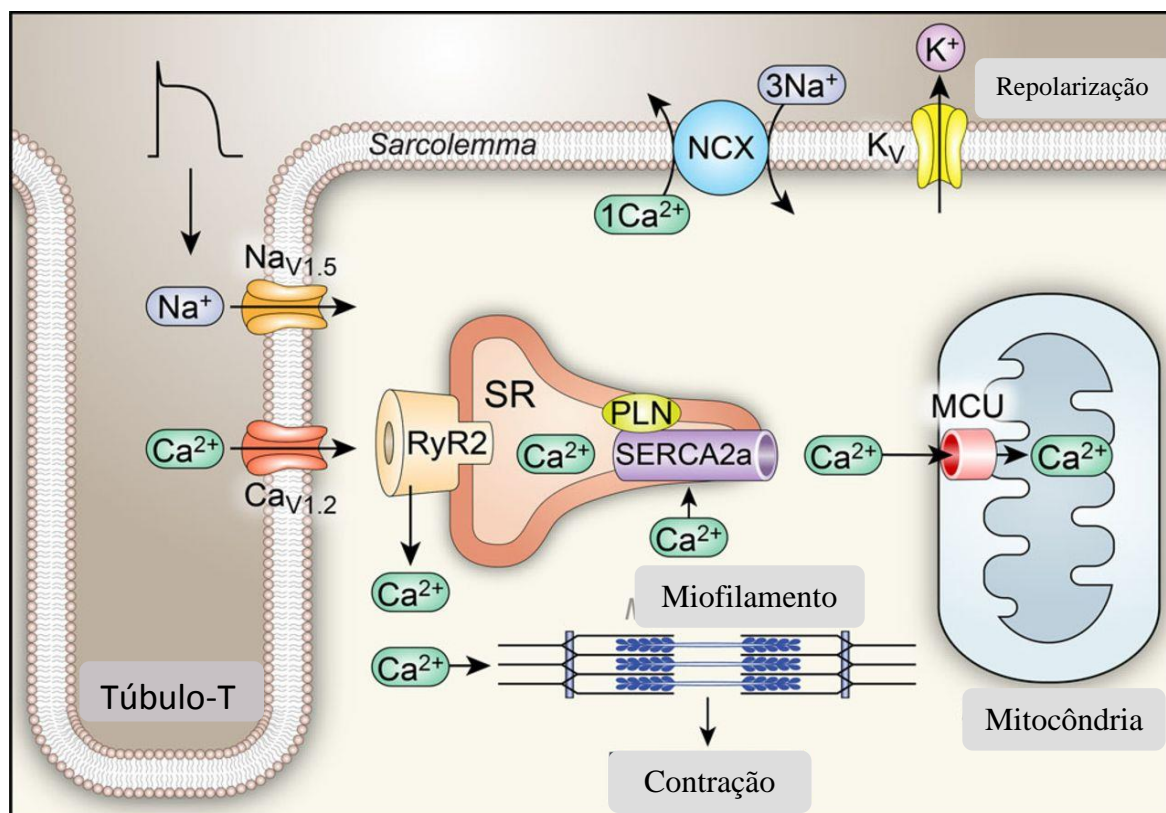
grande quantidade de  $\text{Ca}^{2+}$ , que enfim ativará os miofilamentos contráteis. A esta resposta é dado o nome de liberação de  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$  induzida (Fabiato, 1985; Lehman *et al.*, 2009; Lehman & Craig, 2008).

Para que ocorra a contração dos cardiomiócitos os íons  $\text{Ca}^{2+}$  devem interagir com os sítios ativos da actina que se encontram bloqueados pela tropomiosina durante o repouso. No momento da interação entre a cTnI e a tropomiosina, ocorre inibição do sítio ativo da actina. A subunidade cTnC possui alta afinidade pelo íon  $\text{Ca}^{2+}$ , desta forma o aumento da concentração deste íon no citoplasma do miócito promove sua ligação a cTnC com consequente afastamento da tropomiosina e remoção da interação entre actina e miosina. Durante a contração, a TnC se liga ao  $\text{Ca}^{2+}$ , a tropomiosina é afastada removendo a inibição a ligação entre actina e miosina. Ainda na presença da ligação  $\text{Ca}^{2+}$ -troponina C, outra subunidade da troponina encontra-se ligada à tropomiosina, a cTnT. A interação entre troponina T e tropomiosina faz com que esta última seja deslocada e exponha o sítio de ligação da actina. Sendo então o momento no qual a miosina se liga à actina desencadeando a contração (Huxley; Hanson, 1954; Solaro; Rarick, 1998; Moss *et al.*, 2004).

Durante o processo de diástole a maior porcentagem das pontes cruzadas que existem entre os miofilamentos contráteis se encontram bloqueadas fisicamente pelo filamento fino. Adicionalmente, podem-se observar pontes cruzadas ligadas fracamente e incapazes de gerar força. Ocorre liberação do bloqueio físico dos miofilamentos contráteis, durante o processo de sístole, por meio da ligação do cálcio em sítios proteicos regulatórios (Solaro; Rarick, 1998).

O relaxamento da fibra ocorre pela remoção do cálcio citosólico por meio de quatro sistemas de transporte. O principal é a bomba de  $\text{Ca}^{2+}$ ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA-2a). Ela recapta o  $\text{Ca}^{2+}$  e o armazena no seu interior. A condição de fosforilação da fosfolambam (PLB) (proteína que se encontra agregada a SERCA-2a) influencia diretamente no bombeamento do  $\text{Ca}^{2+}$  via SERCA-2a. Quando não fosforilada, a PLB inibe a SERCA-2a. Logo, quando fosforilada a PLB deixa de inibir a SERCA-2a que capta  $\text{Ca}^{2+}$  para o interior do retículo sarcoplasmático (RS) promovendo o relaxamento da fibra (Frank *et al.*, 2003; Yano *et al.*, 2005). Um segundo sistema de extrusão de cálcio é o trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  que coopera para a retirada do  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático ao longo da

diástole promovendo a entrada de 3 íons  $\text{Na}^+$  para cada 1 íon  $\text{Ca}^{2+}$  que sai da célula (Wier et al, 1989)(ver figura 3). A força que movimenta este trocador advém do gradiente eletroquímico do  $\text{Na}^+$ , mantido pelo bombeamento ativo da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  -ATPase. Outros dois mecanismos de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  do citosol menos representativos quantitativamente são a bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  do sarcolema e o uniporter mitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$  (Bers, 2000).



**Figura 3: Homeostase de  $\text{Ca}^{2+}$  e o acoplamento excitação-contracção.** O processo de acoplamento excitação-contracção é iniciado quando um potencial de ação excita a membrana celular do miócito (sarcolemma) ao longo de seus túbulos transversais. Este processo abre rapidamente canais de  $\text{Na}^+$  dependentes de voltagem (principalmente  $\text{Na}_v 1.5$ ) que despolarizam ainda mais a membrana celular, permitindo a abertura de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem (principalmente  $\text{Ca}_v1.2$ ). A corrente interna de  $\text{Ca}^{2+}$  desencadeia a abertura dos canais do receptor de ryanodina ( $\text{RyR2}$ ) por um processo de liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  induzido por  $\text{Ca}^{2+}$ , resultando na saída coordenada de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático (RS) que contribui majoritariamente com a ativação de miofilamento via cálcio intracelular. O  $\text{Ca}^{2+}$  liberado pelo SR liga-se à troponina C do complexo troponina-tropomiosina nos filamentos de actina em sarcômeros, facilitando a formação de pontes cruzadas entre actina e miosina e a contração miocárdica. Os canais de  $\text{K}^+$  dependentes de voltagem se abrem para permitir uma corrente

externa que favorece a repolarização da membrana, estabelecendo as condições necessárias para o relaxamento. O relaxamento ocorre quando  $\text{Ca}^{2+}$  é levado de volta para o RS através da ação da SERCA-2a e sofre extrusão para fora da célula pelo trocador sarcolemal  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ . A SERCA-2a é inibida pelo PLB sob condições de repouso. Adaptado de Min; Mark, (2013).

O íon cálcio medeia toda a cascata de transdução de sinais do processo de acoplamento actina-miosina, uma vez que por meio de sua ligação na calmodulina, uma proteína que age como sensor de cálcio intracelular, este íon auto regula tais eventos. A calmodulina por sua vez, atua na modulação de eventos na célula ativando a proteína quinase e também por via direta. Esta quinase altera a homeostase do cálcio intracelular por meio da fosforilação de outras proteínas como canais de rianodina, os canais de cálcio do tipo L, a SERCA-2a e PLB (Zhang et al., 2004, Yang et al., 2003). A Calmodulina pode também atuar diretamente no acoplamento excitação-contração por meio da liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático (Xu; Meissner, 2004).

Sendo assim, quaisquer alterações no miocárdio que prejudiquem dinâmica do cálcio ou o funcionamento das miofibrilas contráteis irão comprometer a atividade do ventrículo esquerdo.

### 1.3 ATIVIDADE VENTRICULAR ESQUERDA

A atividade ventricular pode ser avaliada baseando-se nas análises de dois diferentes e complementares aspectos: função sistólica e função diastólica. À função sistólica diz respeito ao inotropismo ou contratilidade, que traduz o desempenho do coração frente a uma determina pré-carga e pós-carga e pode ser quantificado relacionando-se as variáveis: pressão desenvolvida no ventrículo e tempo de encurtamento (tempo decorrido para que se eleve a pressão intraventricular ao máximo). Essas duas variáveis são brilhantemente relacionadas na fórmula  $dP/dt$ , por meio da qual se obtém a variação de pressão em um determinado tempo, durante o aumento da pressão. Assim, o valor de pico máximo ( $dP/dt_{\text{max}+}$ ) consiste em um valioso índice de força do ventrículo e é considerado uma medida de contratilidade ( John et al., 1995).

A função diastólica por sua vez está relacionada ao estado lusitrópico, ou seja, à capacidade de relaxamento do ventrículo. De acordo com De Mey e colaboradores (2001) a quantificação da taxa de relaxamento do ventrículo esquerdo em condições normais e patológicas é importante na avaliação da função de bomba do miocárdio. Foi mostrado também que o relaxamento miocárdico prejudicado é um forte indício do início da insuficiência cardíaca (Lorell, 1991; Leite; Gillebert, 1994). Concluiu-se ainda que a disfunção diastólica é caracterizada pela insuficiência do relaxamento isovolumétrico do ventrículo esquerdo, confirmada pelo aumento da constante TAU (tempo de relaxamento isovolumétrico), pela diminuição do índice  $dP/dt$  de queda da pressão do ventrículo esquerdo ( $dP/dt_{max-}$ ) e por um aumento anormal da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (Verma; Solomon, 2009). Dessa forma, a avaliação da atividade ventricular esquerda pode ser realizada a partir do cálculo destes parâmetros.

#### 1.4 JUSTIFICATIVA

A hipertensão arterial sistêmica é uma doença influenciada por diversos fatores clássicos dos quais se destacam idade, gênero e etnia, excesso de peso e obesidade, ingestão de sal, ingestão de álcool, sedentarismo, fatores econômicos e genéticos. Entretanto, nas últimas décadas o elevado consumo de EAA por atletas profissionais e recreacionais tem levado diversos pesquisadores a cogitarem estas substâncias como novo fator de risco para hipertensão e doenças cardiovasculares (Kanayama; Pope; Hudson, 2001; Kanayama et al, 2003; Bahrke; Yesalis, 2004; Evans, 2004; Cafri et al, 2005; Melnik; Jansen; Grabbe, 2007).

Adicionalmente, dados preocupantes foram publicados por Nguyen et al (2011), apontando que 20% da população dos Estados Unidos entre 24 e 34 anos apresentam pressão arterial sistólica/diastólica com níveis estabelecidos acima de 140/90mmHg, já considerados hipertensivos. Ainda mais preocupante é o fato de que 50% dos 14 mil avaliados não sabiam que apresentavam hipertensão. Ainda no Brasil estudos deste modelo são escassos, entretanto não se pode negligenciar a porção de indivíduos que desenvolveram hipertensão e ainda não diagnosticados fazem uso de EAA.

Apesar de vários estudos visarem compreender os efeitos do uso abusivo de EAA no sistema cardiovascular percebemos que esses se limitam principalmente a animais normotensos. Desse modo existe a necessidade de mais estudos em modelos de animais hipertensos visando o entendimento dos prejuízos causados pelo uso abusivo desta droga.

Visando mimetizar indivíduos nas condições acima citadas, utilizamos ratos espontaneamente hipertensos (SHR) por se tratarem de animais com modelo de hipertensão essencial e devido a seu desenvolvimento de pressão arterial elevada, remodelamento vascular e cardíaco com hipertrofia e deposição de colágeno (Alfredo; Enrique, 1998). Uma grande expansão da pesquisa experimental começou com o desenvolvimento de linhagens de ratos com hipertensão herdada geneticamente. O SHR oferece específica e uniforme predisposição genética, permitindo assim a um estudo das causas, mecanismos e patologia da hipertensão, assim como as suas conseqüências



comportamentais, e a comparação da eficácia de intervenções terapêuticas propostas em relação a tratamentos clínicos já existentes (Alfredo; Enrique, 1998).

Adicionalmente utilizamos o enalapril, que é uma droga do grupo dos inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) por serem um dos principais grupos de drogas usados em pacientes com hipertensão, infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca e outras doenças, e também por seus efeitos em associação com o decanoato de nandrolona serem desconhecidos no modelo proposto, o enalapril foi nossa droga de escolha para realização do co-tratamento com o DECA.

## 2 OBJETIVO GERAL

Avaliar parâmetros morfométricos e a contratilidade do ventrículo esquerdo de animais SHR após tratamento crônico de 4 semanas com doses suprafisiológicas de 20mg/kg por semana de Decanoato de nandrolona (DECA) em associação ou não ao Enalapril.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar os efeitos do tratamento com DECA e da associação desta droga com o enalapril na:

- ✚ Pressão sistólica e Frequência cardíaca no início e final do tratamento;
- ✚ Razão do peso corporal, Ventrículo esquerdo (VE), Próstata e Gordura Epididimal em relação à tibia;
- ✚ Hipertrofia do VE e deposição de colágeno;
- ✚ Pressão intraventricular esquerda (PSVE) e Contratilidade cardíaca por meio das derivadas temporais de pressão máxima positiva ( $dP/dt_{max+}$ ) e negativa ( $dP/dt_{max-}$ ) e Constante de tempo do relaxamento isovolumétrico do ventrículo esquerdo (TAU);
- ✚ Expressão das proteínas Serca2A, PLB e a intensidade da p-Ser16-PLB.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais adotados obedeceram às normas estabelecidas pela comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) aprovados sob o nº42-2015. Foram utilizados ratos SHR adultos, machos, com idade de 12 semanas e peso inicial de  $230 \pm 10$  g, provenientes do Biotério da UFES. Esses animais foram mantidos em ambiente, temperatura (20-24°C) e luz controlados. Ciclo claro-escuro de 12 horas. Todos os animais receberam água e comida de modo irrestrito.

#### 3.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram separados em 4 grupos experimentais, n=6 cada, sendo:

1. **Controle:** Animais tratados com veículo (Água como veículo do Maleato de enalapril via gavagem e Óleo de amendoim como veículo do DECA via intramuscular).
2. **Enalapril:** Animais tratados com Enalapril (Via gavagem)
3. **DECA:** Animais tratados com Decanoato de Nandrolona (Via intramuscular).
4. **DECA+E:** Animais tratados com Decanoato de Nandrolona + Enalapril (Via intramuscular e gavagem respectivamente).

#### 3.2 RESUMO DO PROTOCOLO EXPERIMENTAL

##### 1ª semana do protocolo (11 semanas de idade)

Os animais foram aclimatados no sistema de medida de pressão caudal.

##### 2ª semana do protocolo (12 semanas de idade)

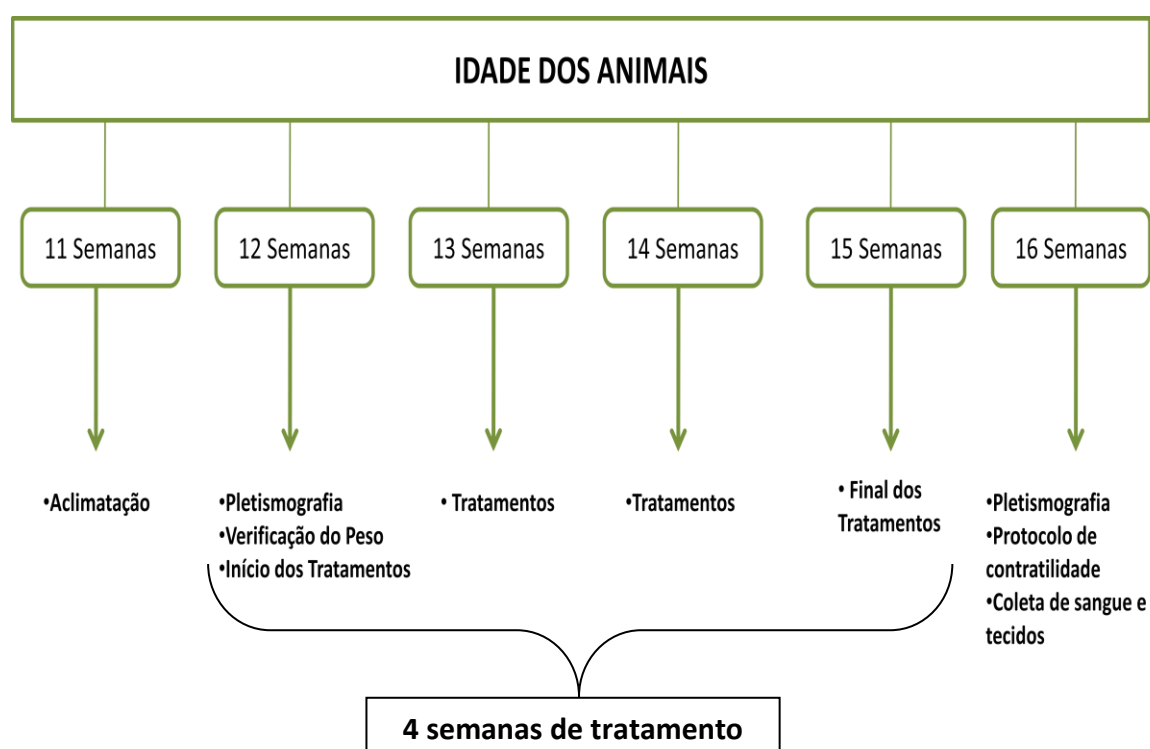
- Determinação da PAS por pletismografia
- Verificação do peso corporal e cálculo da dose a ser administrada nos animais tratados com maleato de enalapril, decanoato de nandrolona e associação.
- Início do tratamento

##### 3ª, 4ª, 5ª semana do protocolo (13, 14, 15 semanas de idade)

- Continuação do tratamento

### 6º semana de protocolo (16 semanas de idade)

- Verificação do peso corporal
- Pletismografia
- Avaliação da contratilidade do Ventrículo Esquerdo (VE)
- Coleta de sangue e tecidos para análise



**Figura 4.** Resumo do protocolo experimental. Fonte: Melo Junior, 2017.

### 3.3 REGISTRO DA PRESSÃO SISTÓLICA (PAS)

Para determinação da PAS foi utilizado o método de Pletismografia de cauda, fabricado pela II TC Life Science Inc (Woodland Hills, CA, EUA). Os ratos foram acondicionados em tubo cilíndrico de acrílico, no qual a região proximal da cauda se encaixa a um manguito de borracha ligado ao esfigmomanômetro para insuflar e desinsuflar automaticamente em intervalos fixos de aproximadamente 40 segundos. Próximo ao manguito foi acoplado um transdutor de pulso (sensor) que captou os sinais a serem enviados e registrados no computador. O

experimento foi realizado pelo mesmo operador e todas as medidas foram realizadas pela manhã. As medidas de pressão utilizadas neste estudo só tiveram início após um período de aclimação, onde os animais por três vezes, em dias diferentes, por dez minutos foram inseridos no aparelho da mesma forma que foram submetidos para medida de PAS, entretanto a pressão não foi registrada. O objetivo deste procedimento foi adaptar os animais a situação da medida de pressão, de maneira a evitar ao máximo sua movimentação durante o registro. A pressão foi medida por pelo menos 5 vezes para cada animal e a média foi utilizada para análise estatística.

### 3.4 TRATAMENTO COM DECANOATO DE NANDROLONA

Os grupos tratados com o EAA receberam DECA (Deca Durabolin®, Organon, São Paulo) na dose de 20 mg/Kg por semana (intramuscular; i.m.) durante 4 semanas. As doses foram divididas em duas aplicações de DECA (10 mg/Kg cada dose) por semana. Volumes iguais de veículo (óleo de amendoim e álcool benzílico 90:10 v/v) foram injetados nos animais do grupo Controle e em dias semelhantes às aplicações dos grupos que receberam o esteroide. Os animais foram pesados semanalmente. O regime de tratamento do EAA foi escolhido baseado em estudos prévios realizados pelo nosso grupo de pesquisa (Franquini et al. 2013).

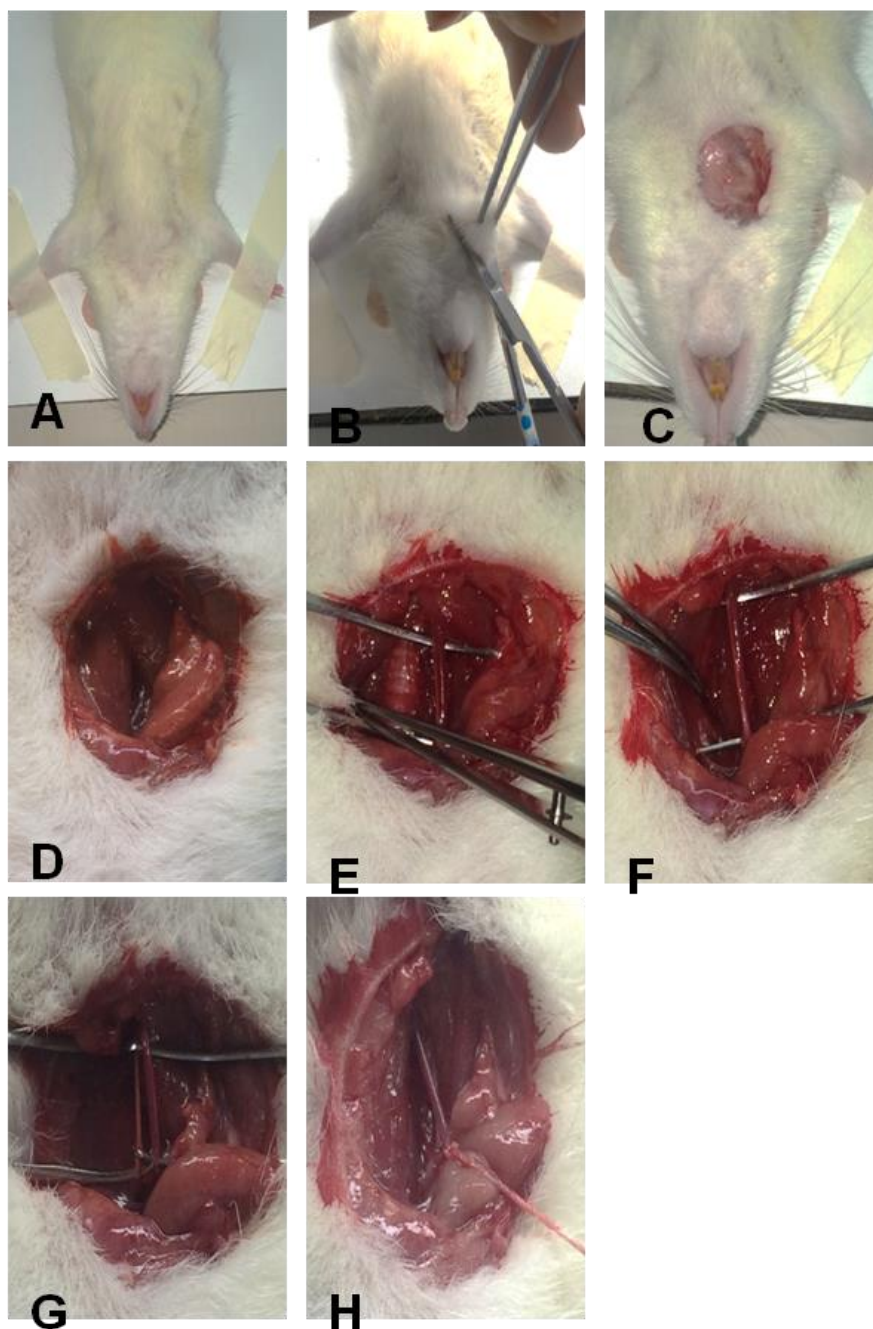
### 3.5 TRATAMENTO COM ENALAPRIL

Os animais do grupo ENALAPRIL foram submetidos ao tratamento diário com maleato de enalapril (10 mg/kg/dia), um inibidor da enzima conversora de angiotensina (IECA) durante 4 semanas. A droga foi administrada por gavagem. Para tanto, os animais foram pesados semanalmente para ajuste da dose.

Os animais do grupo DECA+E receberam ambos os tratamentos, sendo assim os protocolos de tratamento acima citados, se aplicam da mesma forma a este grupo.

### 3.6 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS HEMODINÂMICOS.

Após o período experimental (16 semanas de idade) os animais foram anestesiados com mistura de quetamina (100 mg/kg, AGENER, BRASIL) e xilazina (10 mg/kg, BAYER, BRASIL) via intraperitoneal. Anestesiados e após tricotomia e antissepsia da região mediana e lateral direita da traqueia, os animais foram fixados em uma mesa cirúrgica em decúbito dorsal, com as patas dianteiras fixadas abertamente, cabeça na base inferior da mesa cirúrgica (figura 5A). Em seguida, 3 cm abaixo da sínfise mandibular, a 1cm a direita da linha mediana, foi realizada uma pequena incisão mediana de 2 cm na pele (figura 5B e C). Após retirar fáscia superficial que envolve os tecidos no local e visualizar os músculos esterno hioideo e esternocleido (figura 5D), foi localizada a traquéia (abaixo do esterno hioideo), e carótida comum direita e o nervo vago (figura 5E-F), ao lado e abaixo deste Trígono muscular (esternocleido, esterno hioideo e omohioideo), a mesma foi separada e dissecada do nervo vago (figura 5G). A porção cranial foi ligada com fio cirúrgico (figura 5H) e após uma pequena incisão na parede da artéria carótida comum direita foi inserido cateter de polietileno (PE 50) preenchido com salina e heparina (figura 5).

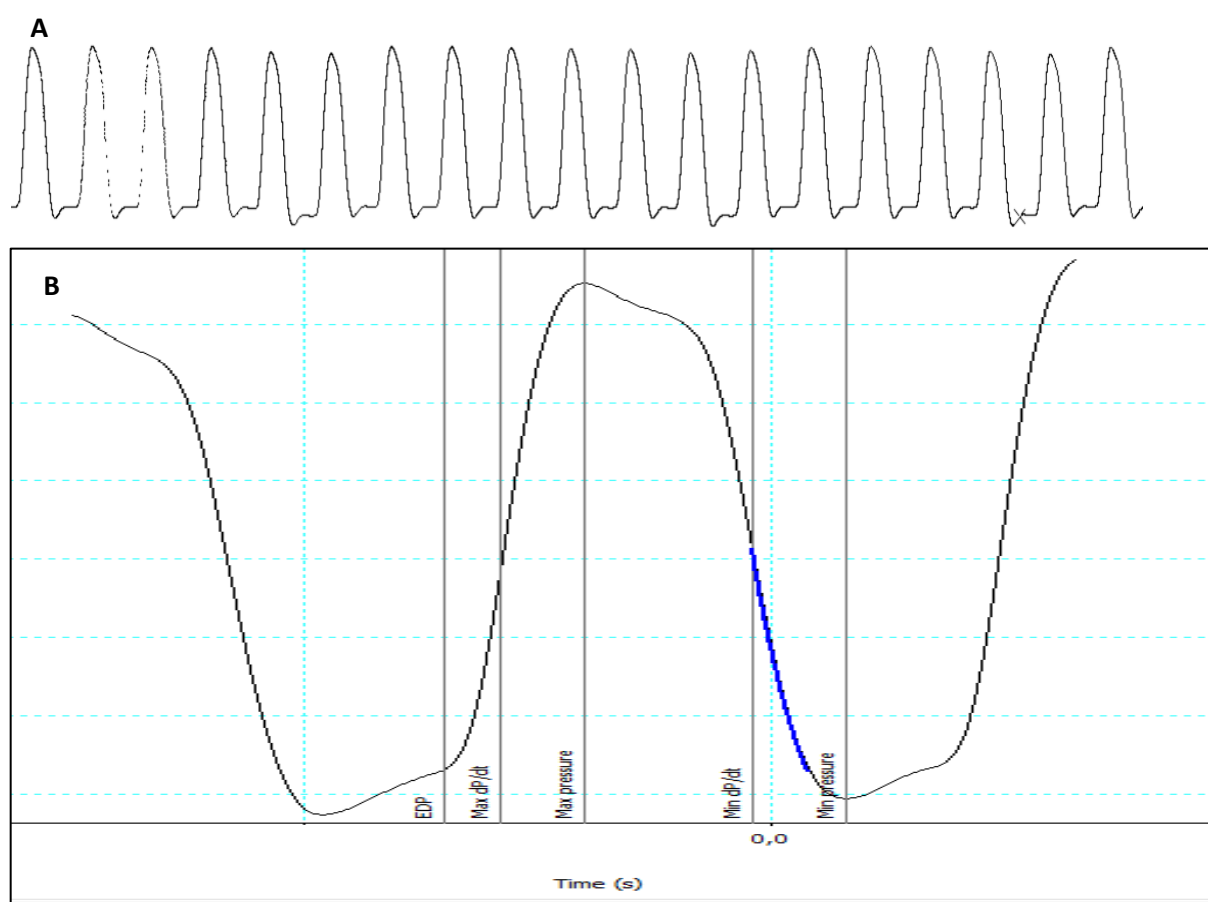


**Figura 5.** . Protocolo de cateterismo da Artéria Carótida Comum Direita. Fonte: Adaptado de Dalpiaz, 2015.

O cateter foi conectado a um transdutor de pressão acoplado a um sistema de aquisição de dados (modelo MP100-CE, Biopac Systems, Santa Bárbara, CA, EUA). Após um período de 15 minutos de estabilização, as pressões arteriais sistólica e diastólica foram registradas. O cateter foi então introduzido no ventrículo esquerdo para aferição dos parâmetros de contratilidade do ventrículo esquerdo, sendo eles:

- ✓ Valores máximos da primeira derivada da pressão ventricular esquerda ( $+dP/dt_{\text{máx}}$ ), que é a taxa máxima de aumento da pressão ventricular;
- ✓ Valores mínimos da primeira derivada da pressão ventricular esquerda ( $-dP/dt_{\text{min}}$ ), que é a taxa de decaimento da pressão ventricular;
- ✓ Constante de tempo do relaxamento isovolumétrico do ventrículo esquerdo (Tau).
- ✓ Pressão sistólica ventricular esquerda (PSVE)

Seguindo este procedimento, o cateter foi retirado do ventrículo esquerdo, e a pressão arterial foi medida novamente para determinar se ocorreu dano à válvula aórtica. Os dados foram analisados utilizando o software LabChart, versão 7 (AD Instruments, Castle Hill, Austrália). A figura 6 apresenta os registros típicos obtidos após o processo de cateterização do VE e o local de onde são coletados os dados.



**Figura 6.** Ondas típicas sucessivas de pressão registradas dentro ventrículo esquerdo (A) e figura representativa de uma onda de pressão apontando os locais de onde foram extraídos os dados (B). Fonte: Laboratório de Hipertensão Experimental, 2017.



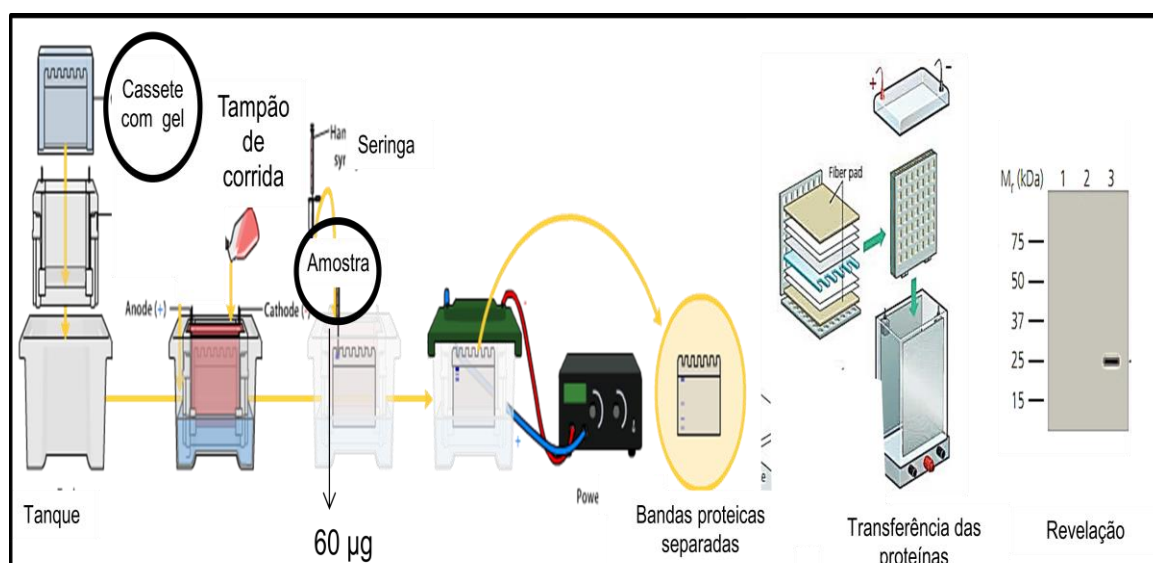
### 3.7 PESO DE ÓRGÃOS E GORDURA

Ao final da avaliação da contratilidade os animais foram sacrificados por injeção *in bolus* de anestésico. O coração, a gordura epididimal e a próstata foram isolados e lavados com solução fisiológica, o excesso de líquido foi removido com papel filtro e em seguida foi pesado. A razão do peso dos órgãos (mg) pelo comprimento da tíbia (cm) (CORAÇÃO/TÍBIA, GORDURA/TÍBIA e PRÓSTATA/TÍBIA) foi usada como índice de hipertrofia.

### 3.8 ANÁLISE DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT

A técnica utilizada para detecção da expressão das proteínas SERCA-2a, PLB e p-PLB (fosfo-serina-16-fosfolambam; p-Ser16-PLB) no ventrículo esquerdo foi a de western blot.

Oitenta miligramas de tecido do ventrículo esquerdo foram homogeneizados em tampão de lise (100 mmol/L de NaCl, 50 mmol/L de Tris-base, 5 mmol/L de EDTA, 2 Na, 50 mmol / L de  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ , 1 mmol / L de  $\text{MgCl}_2$ , 1% de Nonidet P40, 0,3% de Triton x-100 e 0,5% de desoxicolato de sódio, pH = 8), contendo inibidor de protease (Sigma Fast, Sigma, EUA) e inibidores de fosfatase (20 mmol/L de NaF, 1 mmol/L de  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ). As proteínas totais foram medidas pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Oitenta microgramas de proteína foram diluídos em tampão (5x - 2M Tris, pH = 6,8, 20% glicerol, 30% SDS, 25% mercaptoetanol, 0,1% Bromophenol Blue) e foram separados por eletroforese usando SDS-PAGE (Figura 7).



**Figura 7:** Esquema global de uma eletroforese em gel. Fonte: Adaptado de <http://www.creative-diagnostics.com/Sample-Gel-Preparation.htm>.

As proteínas foram transferidas para membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF) (Biorad). Após incubação com solução de bloqueio (Tris 20 mM, NaCl 150 mM pH 7,6, Tween a 0,05% e albumina a 4%), as membranas foram incubadas a 4°C, durante a noite com anticorpos específicos primários: anti-SERCA-2a ([1:2500] , Abcam, Cambridge, MA, EUA), anti-PLB ([1: 1000], Abcam, Cambridge, MA, EUA), anti-p-Ser16-PLB ([1: 1000], Abcam, Cambridge, MA, EUA) e anti-gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) ([1:3000] Santa Cruz Biotecnologia, Santa Cruz, CA, EUA). Em seguida, as membranas foram lavadas (5 min três vezes) e incubadas durante uma hora com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (HRP) [1:5.000]: anti-IgG *mouse* (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) anti-IgG *rabbit* (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As bandas imunorreativas foram detectadas com uma reação de quimioluminescência utilizando substrato de peroxidase (*Luminata HRP Substrate-Millipore*) e a reação foi captada e quantificada pelo software Bio-rad Image Lab 5.2.1. Em cada ensaio experimental fez-se a normalização em relação ao controle, sendo GAPDH para SERCA-2a e PLB total, com vista a diminuir os possíveis erros associados às variações nas concentrações das proteínas. Para análise do p-Ser16-PLB foi realizado a razão p-SER16-PLB/PLB total. Os resultados foram expressos como percentual (%) do controle.

### 3.8 ANÁLISES HISTÓLOGICAS

Os ventrículos foram armazenados em solução de formol (10%) tamponado para as análises histológicas.

Após 24h em solução de formol, os tecidos cardíacos foram processados, incluídos em parafina e cortados em micrótomo manual rotativo (LEICA), com espessura de 5  $\mu$ m. Posteriormente os tecidos foram corados com hematoxilina/eosina (H&E) e Picrosirius *red* (*Sirius Red*), para avaliação de hipertrofia cardíaca e deposição de colágeno, respectivamente.

Para análise morfométrica dos órgãos, 10 campos por lâminas de cada animal foram fotografados, com o auxílio de um software de obtenção de imagens

(Motic Cam Plus®), no aumento de 400X e o número de núcleo de miócitos por campo e a área do núcleo de miócitos foi compilada utilizando o software livre Image J®.

### 3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) para todos os grupos estudados, comparando-se o grupo Controle com os demais. Os níveis de significância estabelecidos foram  $p < 0,05$ . Para a análise estatística, foram realizadas análises de variância (ANOVA) uma via, seguida pelo cálculo das diferenças mínimas significativas entre as médias pelo teste post-hoc Tukey.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 AVALIAÇÃO DO PESO CORPORAL INICIAL E FINAL, GORDURA EPIDIDIMAL E PRÓSTATA.

Na tabela 1 encontram-se os parâmetros biométricos dos grupos estudados. Observa-se que todos os animais partiram de pesos corporais semelhantes, todavia o tratamento com DECA e a associação com o Enalapril não foram capazes de promover alterações nesta variável quando comparados aos grupos Controle e Enalapril.

A razão da gordura pelo comprimento da tíbia foi calculada a fim de avaliar a influência do tratamento sobre o tecido adiposo. Foi observado que o tratamento com DECA reduz a razão em relação ao grupo Controle e Enalapril. A associação com Enalapril foi capaz de reverter esta alteração. O tratamento com DECA promoveu aumento da razão da próstata com a tíbia, entretanto o Enalapril não foi capaz de impedir essa alteração quando comparado ao controle.

**Tabela 1:** Parâmetros biométricos dos grupos Controle, Enalapril, DECA e DECA+E.

n=6	CONTROLE	ENALAPRIL	DECA	DECA+E
Peso corporal inicial (g)	236 ± 3	239 ± 2	248 ± 2	238 ± 9
Peso corporal final (g)	268 ± 8	261 ± 3	261 ± 7	263 ± 4
Gordura epididimal/Tíbia (g/cm)	2,25 ±0,09	2,15 ±0,15	1,68 ±0,12*+&	2,03±0,20
Próstata/Tíbia (g/cm)	0,27 ±0,010	0,28 ±0,006	0,36 ±0,012*+	0,33 ±0,005*+

Os valores foram apresentados com média ± EPM. \* p< 0,05 vs Controle; + p< 0,05 vs animais tratados com Enalapril, &p< 0,05 vs animais tratados com DECA + Enalapril (ANOVA de uma via seguido de pos hoc de Tukey).

## 4.2 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS DO VENTRÍCULO ESQUERDO

Na tabela 2 estão representados os resultados referentes ao peso do ventrículo esquerdo (VE), comprimento da tíbia (CT) e a razão do peso do VE com o comprimento da tíbia (VE/CT). Não foram observadas diferenças entre os grupos com relação ao peso dos ventrículos e comprimento da tíbia, entretanto a razão VE/CT encontra-se aumentada em relação ao grupo controle e o grupo Enalapril. Além disso, a associação com enalapril foi capaz de impedir esse aumento.

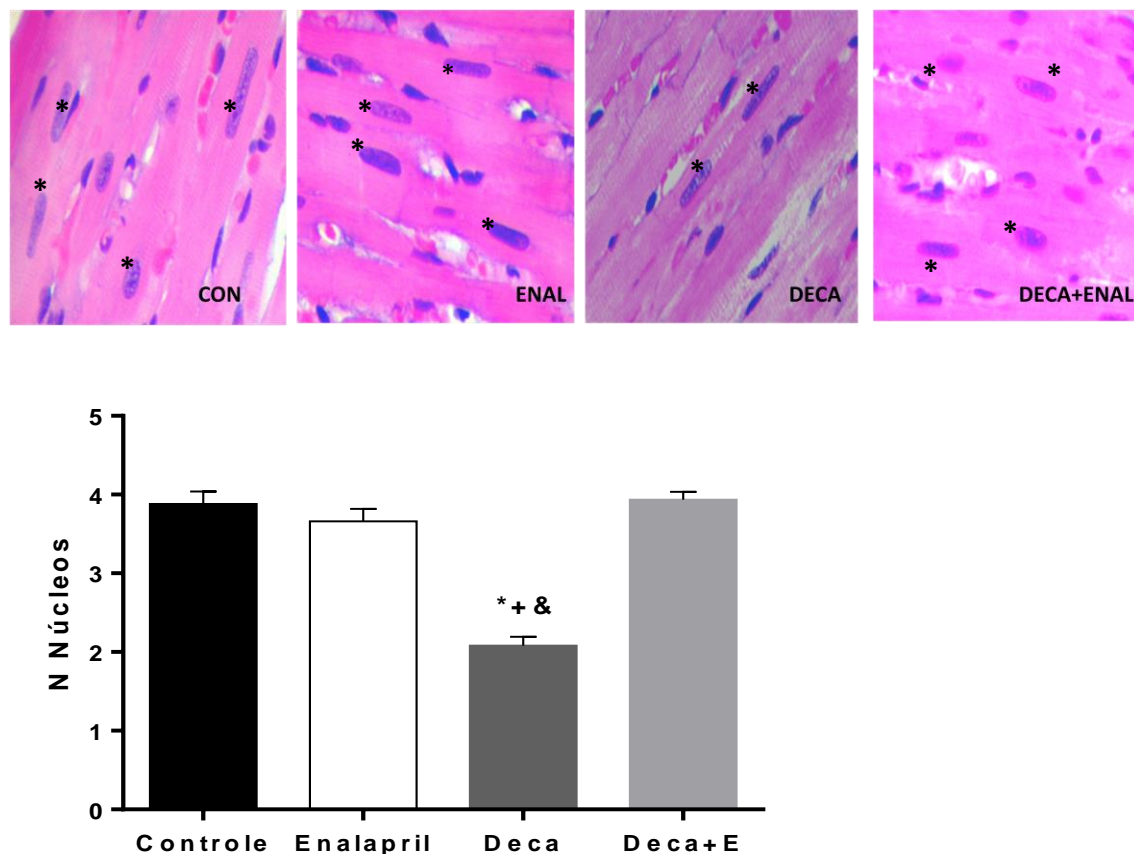
**Tabela 2:** Efeito do tratamento com decanoato de nandrolona sobre o peso do ventrículo esquerdo, comprimento da tíbia, razão do peso ventrículo esquerdo/comprimento da tíbia.

Grupo	Ventrículo Esquerdo	Comprimento da Tíbia	VE/CT
n=6	(mg)	(cm)	(mg/cm)
Controle	717,1 ± 1	3,8 ± 0,02	185 ± 3
Enalapril	707,9 ± 15	3,9 ± 0,02	180,4 ± 5
DECA	759,2 ± 27	3,8 ± 0,02	203,8 ± 4 <sup>*+&amp;</sup>
DECA + E	729,9 ± 14	3,9 ± 0,04	187,1 ± 3

Grupos Controle, Enalapril, DECA (decanoato de nandrolona), DECA + E (Decanoato de nandrolona + enalapril). Os valores foram apresentados com média ± EPM. n=6 por grupo. \* p< 0,05 vs controle; + p< 0,05 vs animais tratados com enalapril, & p< 0,05 vs animais tratados com Decanoato de Nandrolona + Enalapril. A análise estatística utilizada foi análise de variância (ANOVA) de uma via seguido de pos hoc de tukey.

### 4.3 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM DECA SOBRE PARÂMETROS MORFOLÓGICOS.

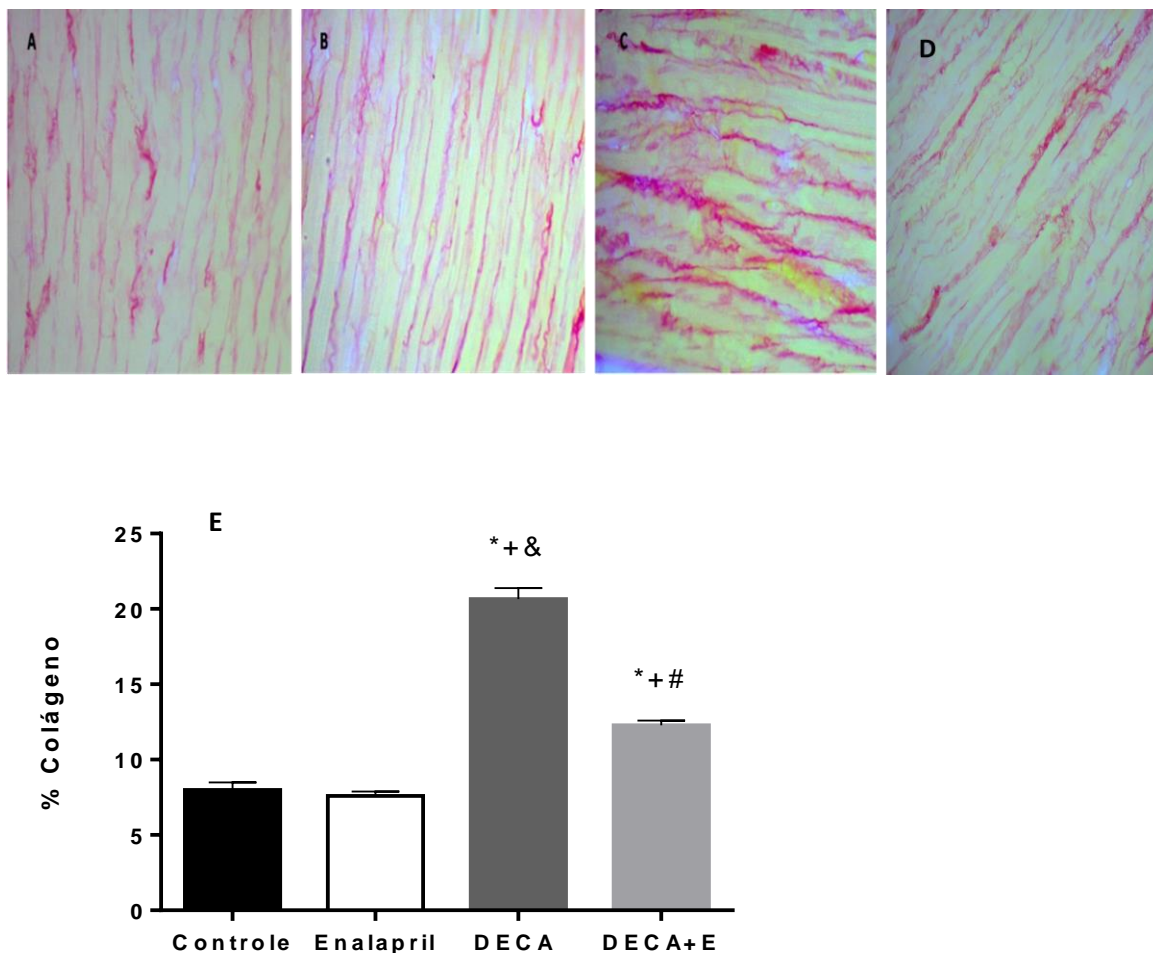
A figura 8 representa a contagem de núcleos dos miócitos. Não existem diferenças significativas entre os grupos controle ( $3,8 \pm 0,16$ ) e enalapril ( $3,66 \pm 0,16$ ), entretanto o tratamento com DECA reduz o número de núcleos por campo ( $2,08 \pm 0,11$ ) e a associação com o enalapril é capaz de prevenir essa alteração ( $3,93 \pm 0,10$ ).



**Figura 8.** Análise histológica do ventrículo esquerdo para avaliação da hipertrofia. Lâminas Histológicas representativas do VE nos grupos Controle, Enalapril, DECA e DECA+E. As amostras foram coradas pelo método Hematoxilina/Eosina (H&E) e fotografadas no aumento de 400x. Contagem de núcleos dos cardiomiócitos grupos Controle, Enalapril, DECA e DECA+E. Os valores foram apresentados com média  $\pm$  EPM.  $n=6$ , \*  $p < 0,05$  vs controle; +  $p < 0,05$  vs animais tratados com enalapril, #  $p < 0,05$  vs animais tratados com Decanoato de Nandrolona; &  $p < 0,05$  vs animais tratados com Decanoato de Nandrolona + Enalapril (ANOVA de uma via seguido de pos hoc de Tukey).

A figura 9 permite visualizar a coloração de picrossírius red que demarca em vermelho o colágeno presente nas lâminas de VE conforme figuras A (grupo Controle) e B (grupo Enalapril), figura C (DECA) e figura D (grupo DECA+E).

Conforme a figura 9 (E) não foram observadas diferenças entre os grupos Controle ( $7,98 \pm 0,21$ ) e Enalapril ( $7,60 \pm 0,12$ ), todavia o DECA aumenta a porcentagem de colágeno ( $20,67 \pm 0,29$ ) e o enalapril associado reduz esse aumento no DECA+E ( $12,28 \pm 0,13$ ).

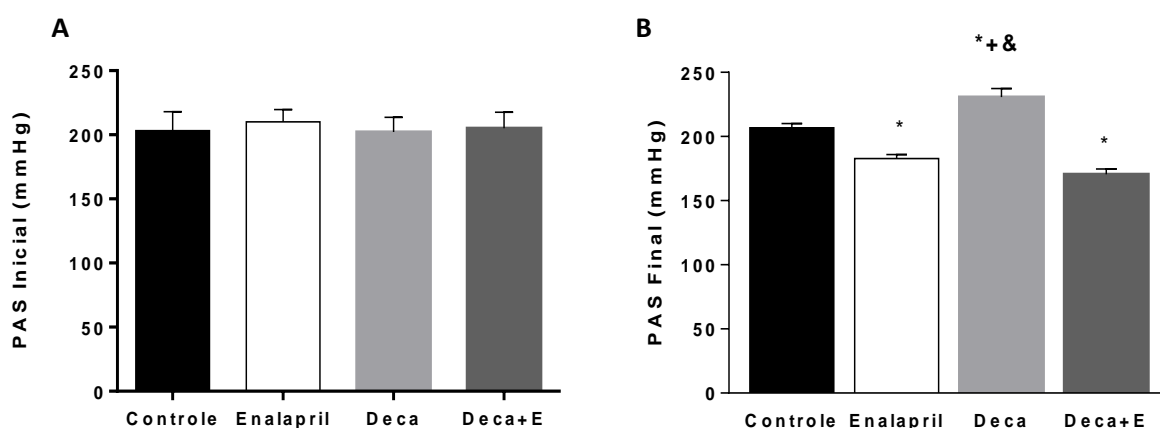


**Figura 9.** Lâminas de VE após coloração de Picrosirius Red dos grupos Controle (A), Enalapril (B), DECA (C) e DECA+E (D) fotografadas no aumento de 400x. Porcentagem de colágeno (figura E). Os valores foram apresentados com média  $\pm$  EPM.  $n=6$  \*  $p < 0,05$  vs controle; +  $p < 0,05$  vs animais tratados com enalapril, #  $p < 0,05$  vs animais tratados com Decanoato de Nandrolona; &  $p < 0,05$  vs animais tratados com Decanoato de Nandrolona + Enalapril (ANOVA de uma via seguido de pos hoc de Tukey).

#### 4.4 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DOS TRATAMENTOS NOS PARÂMETROS HEMODINÂMICOS E CONTRATILIDADE CARDÍACA (PAS, FC, PSVE, TAU, DP/DTMAX+ E DP/DTMAX-).

##### 4.4.1 Avaliação da pressão arterial sistólica (PAS) inicial e final

Na figura 10 estão representados os valores de pressão, obtidos em animal acordado antes e depois dos tratamentos. Todos os animais apresentaram pressão inicial semelhante (Controle:  $203 \pm 5$ ; Enalapril:  $210 \pm 4$ , DECA:  $202 \pm 4$ ; DECA+E:  $205 \pm 5$  mmHg) (figura 10-A). Entretanto, ao final do tratamento conforme esperado observamos (figura 10-B) uma redução da PAS no grupo tratado com enalapril ( $182 \pm 3$  mmHg), o decanoato de nandrolona aumenta os valores da PAS ( $230 \pm 6$  mmHg) e o enalapril associado é capaz de impedir este aumento e reduzir os valores abaixo do controle igualdando-se aos animais tratados com enalapril isolado ( $170 \pm 4$  mmHg).

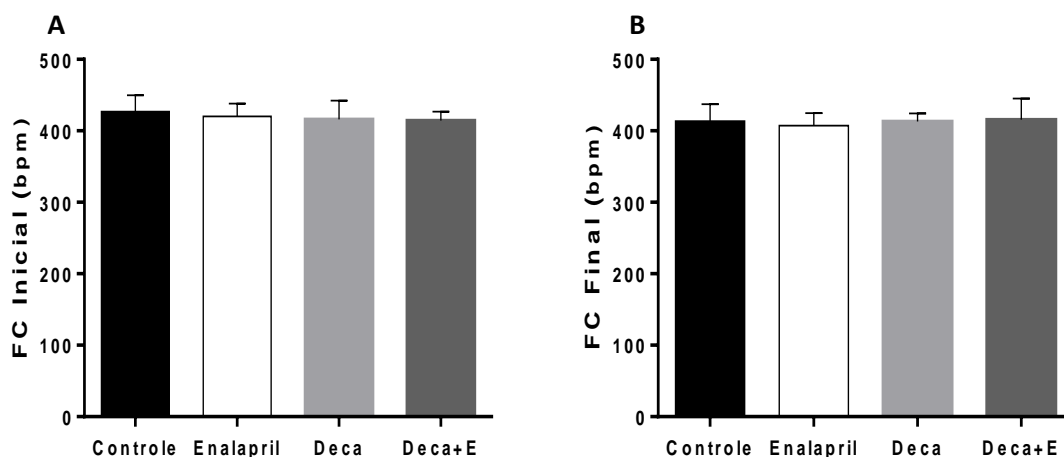


**Figura 10:** Representação da PAS inicial em mmHg (A) e final (B) dos grupos Controle, Enalapril, DECA, DECA+E. Os valores foram apresentados com média  $\pm$  EPM.  $n=6$  \*  $p < 0,05$  vs controle; +  $p < 0,05$  vs animais tratados com enalapril, & $p < 0,05$  vs animais tratados com Decanoato de Nandrolona + Enalapril (ANOVA de uma via seguido de pos hoc de Tukey).

##### 4.4.2 Avaliação da frequência cardíaca inicial e final

A figura 11 apresenta os valores de frequência cardíaca avaliadas em animal acordado no início e no final do tratamento. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos.

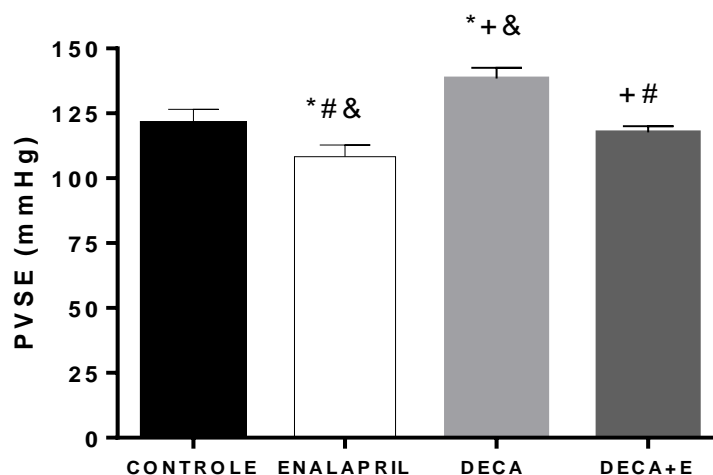




**Figura 11.** Valores de frequência cardíaca inicial (figura A) e final (figura B) nos grupos Controle, Enalapril, DECA, DECA+E. Os valores foram apresentados com média  $\pm$  EPM.

#### 4.4.3 Avaliação da Pressão Sistólica Ventricular Esquerda

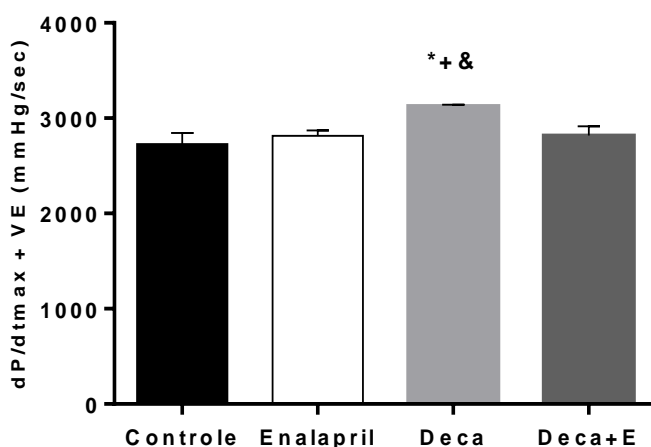
Na figura 12 estão apresentados os dados da pressão sistólica ventricular esquerda (PSVE). O tratamento com enalapril ( $109 \pm 0,7$  mmHg) reduz esse parâmetro quando comparado ao controle ( $126 \pm 1$  mmHg). Em contraposição ao enalapril, o tratamento com DECA aumenta a PSVE ( $135 \pm 1$  mmHg) e a associação com o enalapril é capaz de impedir o aumento causado pelo DECA reduzindo este parâmetro a níveis ao grupo controle ( $117 \pm 0,4$  mmHg).



**Figura 12.** Medida da Pressão ventricular sistólica esquerda dos grupos Controle, Enalapril, DECA e DECA+ E. Os valores foram apresentados com média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  vs controle; +  $p < 0,05$  vs animais tratados com enalapril, #  $p < 0,05$  vs animais tratados com Decanoato de Nandrolona; &  $p < 0,05$  vs animais tratados com Decanoato de Nandrolona + Enalapril (ANOVA de uma via seguido de pos hoc de Tukey).

#### 4.4.4 Avaliação da contratilidade do ventrículo esquerdo

A figura 13 representa o índice de contratilidade da fase de contração isovolumétrica ( $dP/dt_{max+}$ ). O tratamento com DECA aumenta o valor da derivada ( $3128 \pm 13$  mmHg/sec) em relação ao controle ( $2729 \pm 116$  mmHg/sec), o tratamento com enalapril não altera esse parâmetro ( $2814 \pm 56$  mmHg/sec) e a associação do DECA com Enalapril é capaz de prevenir essa alteração promovida pelo anabolizante ( $2819 \pm 95$  mmHg/sec).

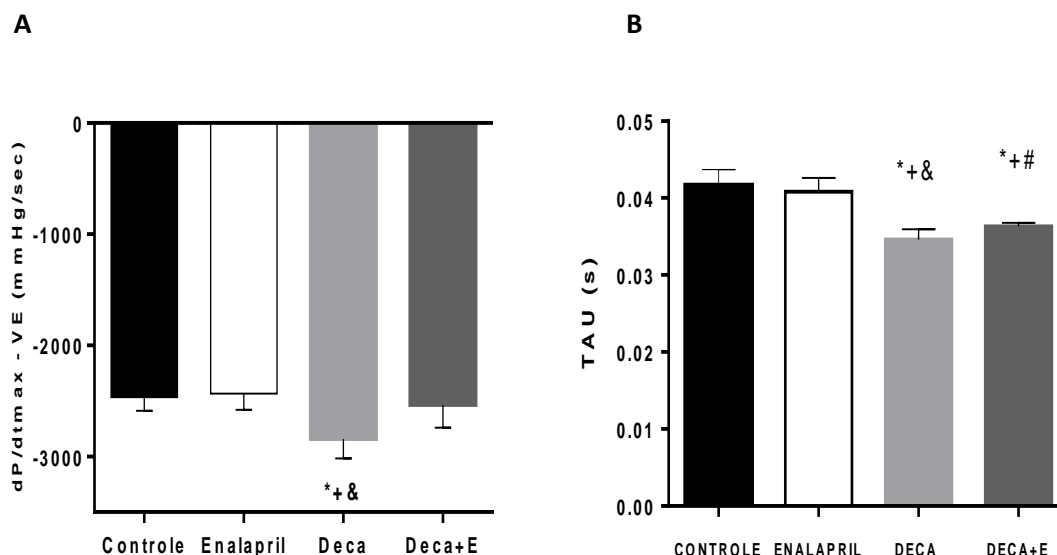


**Figura 13.** Representação do índice de contratilidade da fase de contração isovolumétrica ( $dP/dt_{max+}$ ) em mmHg/sec dos grupos Controle, Enalapril, DECA, DECA+E. Os valores foram apresentados com média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  vs controle; +  $p < 0,05$  vs animais tratados com enalapril, &  $p < 0,05$  vs animais tratados com Decanoato de Nandrolona + Enalapril (ANOVA de uma via seguido de pos hoc de Tukey).

#### 4.4.5 Avaliação do relaxamento do ventrículo esquerdo

O relaxamento ventricular esquerdo foi avaliado por meio do índice de relaxamento isovolumétrico ( $dP/dt_{max-}$ ) e da Constante do tempo de relaxamento isovolumétrico (TAU) conforme figura 14 A e B respectivamente. O tratamento com Decanoato de Nandrolona foi capaz de reduzir a  $dP/dt_{max-}$  ( $-2841 \pm 77$  mmHg/sec) quando comparado ao grupo controle ( $-2638 \pm 128$  mmHg/sec), o tratamento com Enalapril isolado não alterou este parâmetro ( $-2434 \pm 64$  mmHg/sec) e o Enalapril associado ao Decanoato de Nandrolona foi capaz de prevenir essa alteração ( $-2535 \pm 91$  mmHg/sec). A constante de

relaxamento isovolumétrico foi reduzida pelo tratamento com o DECA ( $0,034 \pm 0,0005$  s) quando comparado ao grupo controle ( $0,041 \pm 0,0008$  s) e enalapril ( $0,040 \pm 0,0007$  s). O tratamento do enalapril associado ao DECA não previne totalmente ( $0,036 \pm 0,0002$  s) a queda promovida pelo tratamento isolado com o anabolizante.



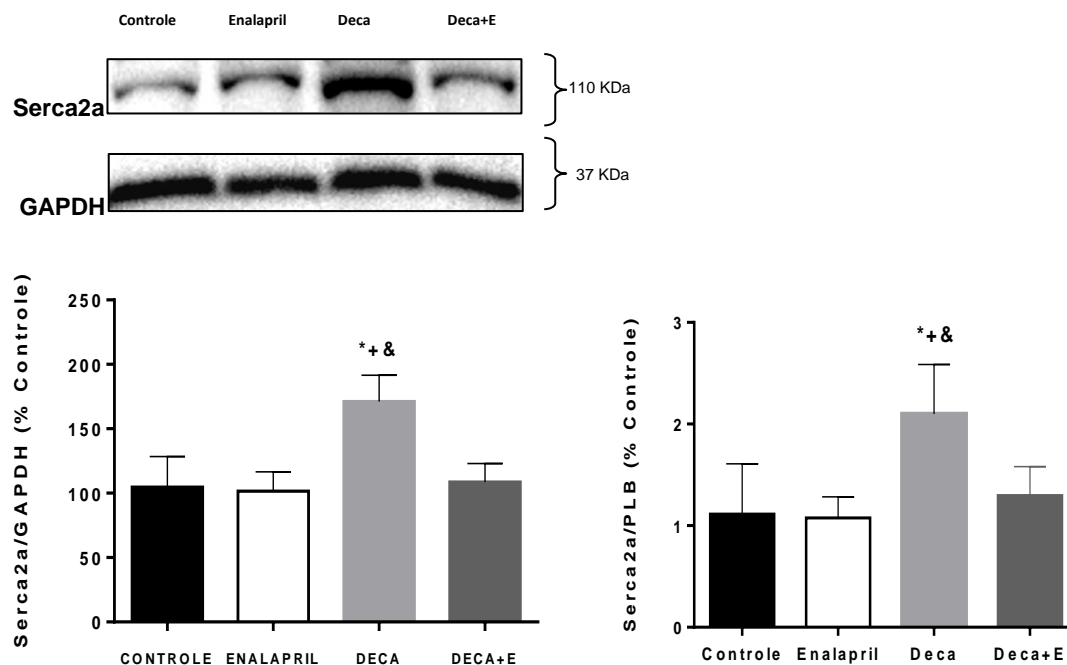
**Figura 14.** Representação do índice de relaxamento da fase de contração isovolumétrica ( $dP/dt_{max}$  -) em mmHg/seg e Constante do tempo de relaxamento isovolumétrico (TAU) dos grupos Controle, Enalapril, DECA e DECA+ E. Os valores foram apresentados com média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  vs controle; +  $p < 0,05$  vs animais tratados com enalapril, #  $p < 0,05$  vs animais tratados com Decanoato de Nandrolona; &  $p < 0,05$  vs animais tratados com Decanoato de Nandrolona + Enalapril (ANOVA de uma via seguido de pos hoc de Tukey).

#### 4.5 EFEITO DOS TRATAMENTOS COM DECA e ENALAPRIL SOBRE A EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA DINÂMICA DE CÁLCIO (SERCA-2A, FOSFOLAMBAM e P-FOSFOLAMBAM).

##### 4.5.1 Avaliação da expressão proteica da SERCA-2a no ventrículo esquerdo

Na figura 15 encontram-se os valores referentes à análise da expressão protéica da SERCA-2a, onde o tratamento com DECA aumenta a expressão desta proteína ( $171,19 \pm 8,34$ ) em relação aos grupos Controle ( $104,78 \pm 9,62$ ) e Enalapril ( $101,52 \pm 6,15$ ). O tratamento com enalapril associado ao DECA impediu

o efeito isolado do anabolizante ( $108,58 \pm 5,89$ ), mantendo a expressão da proteína semelhante ao controle. A fim de avaliar a atividade da SERCA-2a, realizamos a razão com o PLB. Foi observado que o DECA aumenta a razão em relação aos demais grupos.

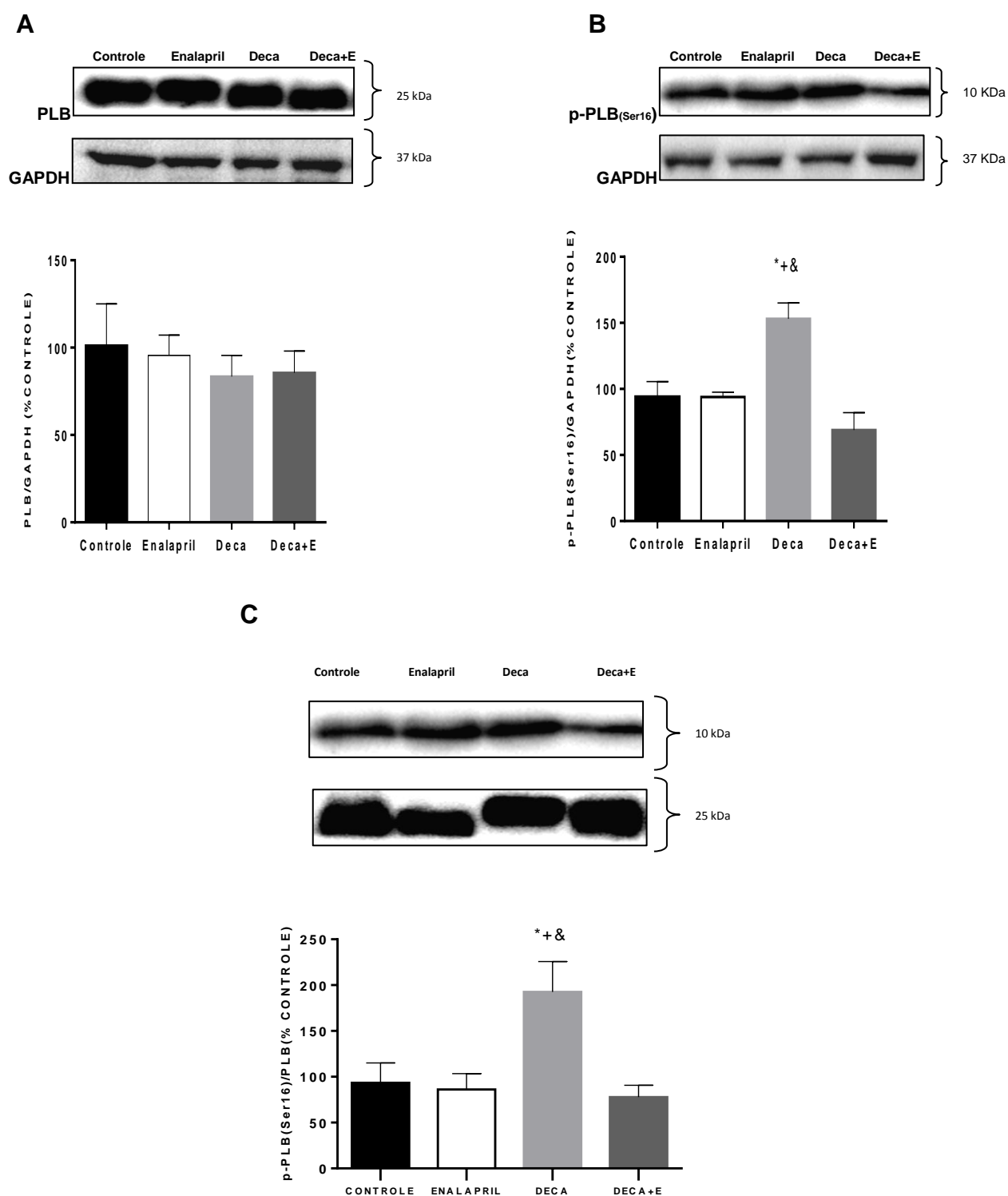


**Figura 15.** Expressão proteica da SERCA-2a no ventrículo esquerdo e razão com PLB. Os valores foram apresentados com média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  vs controle; +  $p < 0,05$  vs animais tratados com enalapril, & $p < 0,05$  vs animais tratados com Decanoato de Nandrolona + Enalapril (ANOVA de uma via seguido de pos hoc de Tukey).

#### 4.5.2 Avaliação da expressão protéica do FOSFOLAMBAM (PLB), e da intensidade da p- FOSFOLAMBAM serina 16 (p-PLB-Ser16) no ventrículo esquerdo e razão com o PLB.

Com relação ao PLB, os tratamentos não alteraram a expressão desta proteína, uma vez que não foram observadas alterações significativas entres os grupos (Controle:  $101,18 \pm 9,76$ ; Enalapril:  $95,52 \pm 4,77$ ; DECA:  $83,41 \pm 4,96$ ; DECA+E:  $85,55 \pm 5,11$ ). A fim de avaliar a porção fosforilada do PLB, utilizamos um anticorpo específico para Serina16. Conforme figura 16 (B), o tratamento com DECA aumenta o p-PLB-Ser16( $153,13 \pm 5,36$ ), em relação aos grupos controle ( $93,80 \pm 5,23$ ) e enalapril ( $93,98 \pm 1,62$ ). O tratamento do enalapril associado à DECA impede o aumento causado pelo anabolizante isolado ( $68,92 \pm 5,85$ ).

A fim de avaliar a proporção do p-PLB-Ser16, a quantidade total fosforilada foi dividida pela quantidade total da porção não fosforilada de PLB. Na figura 16 C observa-se que o tratamento com o DECA aumenta a proporção ( $192,63 \pm 13,4$ ) quando comparado aos grupos controle ( $93,35 \pm 8,85$ ) e enalapril ( $86,15 \pm 7,08$ ). A associação do enalapril com o DECA impede o aumento da proporção ( $77,89 \pm 5,20$ ).



**Figura 16.** Expressão proteica do PLB (figura A), p-PLB-Ser16 (figura B) e proporção da p-PLB-Ser16 no ventrículo esquerdo. Os valores foram apresentados com média  $\pm$  EPM.  $n=6$  \*  $p < 0,05$  vs controle; +  $p < 0,05$  vs animais tratados com enalapril, &  $p < 0,05$  vs animais tratados com Decanoato de Nandrolona + Enalapril (ANOVA de uma via seguido de pos hoc de Tukey).

## 5. DISCUSSÃO

Até o presente momento, este é o primeiro estudo que relaciona o uso de doses suprafisiológicas de esteroides anabolizantes, função cardíaca, efeitos tróficos e a expressão de importantes componentes reguladores do cálcio citosólico (SERCA-2a, PLB, p-PLB-Ser16) no ventrículo esquerdo de ratos SHR.

Os principais achados deste trabalho foram que em ratos SHR o tratamento com doses suprafisiológicas de DECA causa: 1) Aumento da PAS, redução do n° de núcleos e aumento deposição de colágeno; 2) Aumento da dP/dt Max positiva e negativa, PSVE e diminuição do TAU; 3) Aumento da expressão das proteínas SERCA-2a, p-Ser16-PLB e da razão SERCA-2a/PLB. Estas alterações foram revertidos totalmente aos valores do controle após tratamento com enalapril e parcialmente em relação ao TAU.

### 5.1. EFEITO DOS TRATAMENTOS NO PESO CORPORAL, GORDURA EPIDIDIMAL E PRÓSTATA.

No presente estudo não foram observadas alterações no peso corporal ao final do tratamento, o decanoato de nandrolona foi capaz de reduzir a gordura epididimal, entretanto a associação do enalapril impede essa redução. Os resultados encontrados na literatura em relação ao peso corporal final são conflitantes em animais tratados com EAA. Estudos de Franquini et al (2013) demonstraram que animais wistar machos sofrem aumento do peso corporal quando tratados com DECA, 20mg/kg por 4 semanas, por outro Marinho et al. (2006) demonstrou não haver variação do peso corporal em animais normotensos tratados com uma dose semanal de decanoato de nandrolona 10mg/kg por 28 dias quando comparados com ratos controle.

Estudos experimentais realizados por Beutel et al. (2005) com doses suprafisiológicas do DECA, demonstram redução do peso corporal atribuído a inibição do apetite e redução da gordura abdominal, observados somente a partir da quarta semana de tratamento dos animais.

Adicionalmente, segundo Bauman et al., (1988) o tratamento com doses suprafisiológicas de EAA suprime o ganho de peso. Os mecanismos envolvidos com a diminuição do ganho de peso, podem estar relacionados com um decréscimo da produção de testosterona endógena, conversão demasiada de testosterona em estradiol e também aumento da oxidação de lipídeos.

Resultados de Fermo et al., (2008) contribuem para o entendimento de nossos resultados, mostrando que animais normotensos tratados com decanoato de nandrolona de forma semelhante ao presente estudo não apresentam diferenças significativas no que diz respeito ao peso corporal final, entretanto após avaliação da massa magra e gorda pelos métodos de Kjeldahle e Soxhlet respectivamente, foi verificado um aumento muscular seguido de perda gordura. Desta forma, sugerimos que não foram observadas alterações no peso corporal dos animais tratados com DECA, devido à capacidade do anabolizante de atuar no metabolismo de gorduras, promovendo sua redução e de estimular a síntese proteica impedindo assim mudanças significativas no peso corporal.

O uso de esteróides anabólicos androgênicos promove alterações em diversos órgãos como rins, coração, fígado e glândulas como a próstata (Falanga et al., 1998; Takahashi et al., 2004; Fortunato et al., 2006). O tecido prostático é extremamente reativo a hormônios, especialmente os androgênicos e estrogênicos que são fundamentais para o desenvolvimento, manutenção e função da glândula (Ho; Habib, 2011; Nicholson; Ricke, 2011).

Elevadas doses de EAA tem sido associadas ao desenvolvimento de câncer de próstata (Parsons et al., 2005). De acordo com alguns autores o uso abusivo dessas drogas pode comprometer as funções neuroendócrinas causando prejuízos reprodutivos e potencializar o surgimento do câncer de próstata (Venâncio et al., 2010).

Gomes (2014) observou que ratos normotensos, submetidos ao tratamento com DECA, associado ou não ao treinamento físico resistido (TFR), apresentaram ocorrência de alterações adaptativa celular e histopatológica, 100% dos animais que receberam o DECA foi observado metaplasia e em 80% dos animais que receberam DECA e TFR foram identificados neoplasias e outras patologias como focos inflamatórios, além de incidências de inflamação multifocal e neoplasia



intraepitelial prostática. De forma geral, o DECA ou exercício isolado, alteraram a expressão de algumas citocinas pró-inflamatórias, tais como interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), sugerindo que o DECA associado ou não ao TFR, favorece o surgimento de neoplasias na próstata na fase adulta e no envelhecimento, ativando vias envolvidas na resposta inflamatória. Dados de Dalpiaz et al (2013) demonstraram que o tratamento com enalapril (10 mg/kg/dia) por 4 semanas promove redução da interleucina-6 (IL-6) (pró-inflamatória), aumento da interleucina 10 (IL-10) (anti-inflamatória), bem como da razão (IL10/TNF- $\alpha$ ) em animais SHR. Esses dados demonstraram nesses animais a inibição de um dos principais componentes do SRA, além de produzir efeito anti-hipertensivo, também pode exercer papel anti-inflamatório, alterando o perfil de atividade das citocinas.

Nossos dados demonstram a capacidade do decanoato de nandrolona em promover um aumento do peso da próstata, entretanto a associação com o enalapril não preveniu este aumento. Dados de Loiola et al (2011), demonstram um aumento do peso da próstata em ratos normotensos tratados por 8 semanas, utilizando doses 10mg/Kg duas vezes por semana, todavia a associação com enalapril 10 mg/kg/dia igualou o peso da próstata ao dos animais controle, sugerindo participação do sistema renina-angiotensina. Acreditamos que a participação do SRA pode ser dependente do tempo de tratamento, da dose do anabolizante utilizado e do modelo de animal utilizado na promoção da hipertrofia da próstata.

## 5.2 PARÂMETROS HISTOLÓGICOS

O uso abusivo dos EAA é associado de forma bem clara a complicações do sistema cardiovascular como remodelamento (fibrose e hipertrofia ventricular), morte súbita e também aumento dos riscos de acidentes trombóticos como infarto do miocárdio e parada cardíaca (Kicman, 2008; Campbell et al. 1993). Estudos prévios de nosso laboratório contribuem para evidenciar indução da hipertrofia cardíaca, alterações hemodinâmicas após o uso de EAA além da participação do sistema renina angiotensina sobre esses parâmetros (Bissoli et al., 2009; Andrade et al., 2011; Franquini et al., 2013, Nascimento et al., 2016).

Diversos são os mecanismos pelos quais os EAA podem induzir a hipertrofia cardíaca, entre eles estão o clássico mecanismo de ação dos EAA por ação direta sobre o material genético e promovendo aumento da síntese protéica (Kochakian; Welber, 1993), alteração da matriz estrutural do miocárdio e o do fluxo de íons (Melchert; Welder, 1995), alteração em citocinas pró-inflamatórias, como por exemplo, o TNF-alfa (Yokoyama et al., 1997, Franquini et al., 2013), elevação das concentrações de AMPc, contribuindo para geração de uma resposta positiva inotrópica na célula do miocárdio por meio do cálcio (Velasco et al., 2002).

Marsh et al (1998) relataram que a presença de receptores de andrógenos em miócitos cardíacos pode mediar diretamente uma significativa resposta hipertrófica em decorrência do androgênio no coração, desta forma, níveis mais elevados de testosterona em resposta a administração de doses suprafisiológicas de EAA pode induzir hipertrofia cardíaca patológica.

No presente trabalho embora não tenhamos encontrado diferenças no peso do VE nos animais tratados com DECA, foi observado um aumento da razão VE com o comprimento da tibia, redução do número de núcleos do miócito por campo e aumento da deposição de colágeno demonstrando a capacidade deste esteróide de promover hipertrofia patológica do ventrículo esquerdo. Dados de Franquini et al (2013) com ratos normotensos Wistar tratados com DECA na mesma dose, durante 4 semanas, demonstraram haver hipertrofia cardíaca e aumento da deposição de colágeno. Todas as alterações histológicas observadas no presente estudo foram prevenidas quando os animais foram tratados com o enalapril associado ao DECA.

Pelos resultados acima, podemos especular a importante participação do SRA nas alterações ocasionadas pelo DECA em animais SHR. Na literatura já é bem determinado o papel dos receptores da angiotensina II no remodelamento cardíaco. Ambos os receptores de angiotensina 1 e 2 (AT1) e (AT2) apresentam sete domínios transmembrana e são acoplados a proteína G, entretanto apresentam diferentes propriedades funcionais e mecanismos de transdução de sinal. Ichihara et al (2001) demonstraram que o receptor AT2 está relacionado à fibrose cardíaca e deposição de colágeno induzida pela infusão de angiotensina II. Brilla et al (1994) relataram que a angiotensina II estimula a síntese de

colágeno por meio dos receptores AT1 e AT2 em fibroblastos cardíacos de ratos e que a inibição da atividade de collagenase induzida pela angiotensina II é mediada por receptores AT2.

Adicionalmente, a hipertrofia cardíaca ampliada pelo DECA nos animais SHR, com exagerado aumento de colágeno pode ser patológica. Dados da literatura mostram que fisiologicamente o ventrículo esquerdo de um adulto normal possui aproximadamente 2% de colágeno, e que aumento nesta concentração pode alterar as propriedades mecânicas do coração (Shirwany; Weber, 2006). Em relação ao uso do antihipertensivo, estudos demonstram que o tratamento crônico com IECA foi capaz de prevenir ou reduzir a hipertrofia do miocárdio em ratos SHR (Uggere et al., 2000, Bissoli et al., 1991; Thomas et al., 1998) e também da hipertrofia pelo DECA (Andrade et al., 2007, Lima et al 2015). No nosso estudo, o enalapril preveniu o aumento de colágeno cardíaco ocasionado pelo DECA, demonstrando o importante papel do SRA na geração da hipertrofia patológica.

### 5.3 EFEITOS DO DECA E DO ENALAPRIL SOBRE PARÂMETROS HEMODINÂMICOS E CONTRATILIDADE CARDÍACA.

No presente estudo, verificamos que o tratamento isolado com Enalapril foi capaz de reduzir a pressão arterial dos animais SHR quando comparados com o grupo controle. O tratamento com DECA promoveu um aumento da pressão arterial dos animais e a associação com Enalapril foi capaz de prevenir este aumento, mantendo a pressão dos animais nos mesmos níveis que os animais do grupo Enalapril. No que diz respeito à frequência cardíaca, os tratamentos não foram capazes de alterar este parâmetro quando comparados ao grupo controle.

Dados de Bissoli et al (2009), demonstraram que ratos wistar machos jovens tratados com doses supra fisiológicas do Decanoato de Nandrolona (10 mg/kg por semana) durante 8 semanas apresentam aumento da pressão média basal e a frequência cardíaca não sofreu alteração. Adicionalmente, o tratamento de animais machos normotensos por 4 semanas com doses de 20 mg/kg por

semana foi capaz de aumentar a pressão arterial, estabelecendo níveis de hipertensão nestes animais (Franquini et al., 2013).

De fato ambos o estrogênio e o androgênio têm sido implicados no desenvolvimento de doenças cardiovasculares e hipertensão com o estrogênio em geral sendo protetor em relação ao androgênio. Embora o exato mecanismo que os hormônios sexuais contribuem para regulação da função cardiovascular ainda não seja bem elucidado, existem evidências que a modulação local do sistema hormonal seja um dos principais mecanismos envolvidos (Wagner; Moritz; Volk, 2011).

Estudos de Liu e Ely (2011), com ratas SHR evidenciam os efeitos dos hormônios sexuais sobre a pressão arterial, onde ratas ovariectomizadas e tratadas com propionato de testosterona 20 mg/kg, apresentaram elevação da pressão arterial sistólica quando comparadas com ratas controle. Adicionalmente ratas que não sofreram retirada dos ovários tratadas com testosterona nas mesmas doses apresentaram discreta elevação da pressão arterial. Estes dados demonstram o efeito prejudicial de doses suprafisiológicas do androgênio sobre a pressão arterial e o efeito protetor do estrogênio sobre este mesmo parâmetro.

O Enalapril foi capaz de reverter os prejuízos do uso crônico de doses suprafisiológicas do DECA na pressão arterial dos animais. Os dados do presente estudo corroboram os de Loiola et al (2011), onde o enalapril também foi capaz de reverter o aumento da pressão arterial em ratos machos wistar, tratados com DECA.

O acúmulo de colágeno associado à hipertrofia cardíaca normalmente contribui para a perda da capacidade contrátil do coração, aumentando a rigidez ou reduzindo a complacência da parede ventricular, podendo resultar em insuficiência cardíaca (Jalil et al., 1989, Mady et al. 1999). De acordo com Nakayama et al. (1987) a fibrose miocárdica intersticial associada à hipertrofia de cardiomiócitos foi correlacionada com a deterioração do relaxamento miocárdico em pacientes com cardiomiopatia dilatada.

Diversos trabalhos têm evidenciado o estudo da função diastólica como sendo determinante para caracterizar a insuficiência cardíaca. De acordo com De Mey

et al (2001), a quantificação da taxa de relaxamento do ventrículo esquerdo em condições normais e patológicas é importante na avaliação da função de bomba do miocárdio. Foi mostrado também que um relaxamento miocárdico prejudicado é um forte indício do início da insuficiência cardíaca (Lorell, 1991; Leite-Moreira; Gillebert, 1994).

No presente estudo foi avaliada a capacidade contrátil do VE por meio da  $dP/dt_{max+}$  e o relaxamento pela  $dP/dt_{max-}$  e TAU. Foi observado que o tratamento com DECA aumenta a capacidade contrátil do VE, aumenta o relaxamento e reduz o tempo de relaxamento. O enalapril impede as alterações nas derivadas de pressão, entretanto não é capaz de impedir a redução do TAU quando associado o DECA. Marques et al (2016), demonstraram de forma semelhante ao nosso estudo que fêmeas Wistar tratadas com decanoato 20 mg / kg / semana por 28 dias apresentam além de hipertrofia cardíaca, aumento da  $dP/dt_{max+}$  e  $dP/dt_{max-}$  e redução do TAU, alterando a função cardíaca em particular no que diz respeito à função sistólica e a diastólica.

De uma forma mais específica, a análise do período de relaxamento isovolumétrico do ventrículo esquerdo tem sido utilizada como ferramenta para caracterizar a disfunção diastólica. Nesse sentido, a disfunção diastólica é caracterizada pela insuficiência do relaxamento isovolumétrico do ventrículo esquerdo, que pode ser confirmada pelo aumento da constante TAU, pela diminuição do índice  $dP/dt$  de queda da pressão do ventrículo esquerdo ( $dP/dt_{max-}$ ) e por um aumento anormal da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (Verma; Solomon, 2009).

Embora o aumento das  $dP/dt_{max+}$  e  $dP/dt_{max-}$  e a diminuição do TAU demonstrem melhora nos parâmetros de contratilidade do ventrículo esquerdo, o tratamento do presente estudo teve duração de 4 semanas, entretanto é descrito na literatura que os usuários de anabolizantes por insatisfação com o corpo o fazem por ciclos, por diversas semanas e repetidas vezes no ano, na maioria das vezes associados ao exercício físico (Hartgens; Kuipers, 2004). Phillis et al (2000), verificaram que 15 dias de tratamento com decanoato de nandrolona (20 mg / kg, s.c.) não foram suficientes para causar hipertrofia ou alterar a função cardíaca. Estudo de Rocha et al (2007), em ratos normotensos e sedentários, demonstrou que o uso de decanoato de nandrolona por 10

semanas, numa dose mais baixa (10mg/semana), induziu ao remodelamento cardíaco, sem no entanto alterar a  $dP/dt_{max+}$  e  $dP/dt_{max-}$ , entretanto quando associado ao exercício físico aeróbico (natação), houve diminuição da  $dP/dt_{max-}$ , exacerbou a hipertrofia cardíaca e a fibrose intersticial, induzindo a deterioração adicional no desempenho cardíaco. Tanno et al (2011) em ratos normotensos tratado com nandrolona por 6 semanas, além de promover a hipertrofia ventricular esquerda associada a alterações na geometria do ventrículo esquerdo, comprometeu a função sistólica e diastólica e estimulou a expressão de marcadores moleculares de hipertrofia cardíaca patológica, evidenciando o impacto maléfico da associação entre nandrolona e treinamento resistido sobre o sistema cardiovascular. Estes estudos demonstram que o prejuízo na função cardíaca devido ao uso do DECA pode estar relacionado não somente a dose e ao tempo de uso, mas também se exacerbar quando associado ao treinamento resistido.

A influência do SRA sobre os efeitos do uso crônico de doses suprafisiológicas do DECA é clara na medida em que o Enalapril no grupo DECA+E além de reduzir a PAS, a valores dos animais controle, também manteve os índices de hipertrofia cardíaca, parâmetros de contratilidade e relaxamento cardíaco, e as proteínas envolvidas na dinâmica do  $Ca^{2+}$  intracelular aos níveis dos animais controle.

Os resultados deste estudo corroboram os de Loiola et al (2011), realizado anteriormente em nosso laboratório demonstrando que o enalapril também foi capaz de reverter aos valores dos animais controle a PAS. Adicionalmente, Rocha et al 2007, observou que ratos normotensos sedentários e treinados tratados com 10 mg/kg por semana de DECA, mesmo sem alteração na variáveis de contratilidade apresentaram aumento da expressão do receptor AT1 e atividade da ECA na coração. O tratamento com bloqueador de receptores AT1 preveniu a hipertrofia cardíaca e a síntese de colágeno induzidas pelo tratamento com DECA.

Penna et al, (2007) contribui para o entendimento de nossos dados ao demonstrar em seu estudo com ratos Sprague Dawley machos tratados por 14 dias com doses diárias de 15m/kg de decanoato de nandrolona, que esta droga promove aumento da expressão de receptores  $\beta_2$  cardíacos aumentando assim

a contratilidade em animais submetidos ao stress e tratamento agudo com isoproterenol. De forma semelhante, dados de Kang et al (2012) demonstram que o tratamento com propionato de testosterona 2mg/kg por 10 semanas aumenta a contratilidade em ratos com insuficiência induzida pelo isoproterenol.

Adicionalmente outros estudos demonstram que os hormônios exercem importante papel fisiológico na contração e relaxamento do coração, que isso se deva em parte ao mecanismo de modulação da SERCA-2a (Witayavanitkul et al., 2013; Nascimento et al., 2016), Fosfolambam e p-Fosfolambam(Thr17) (Nascimento et al., 2016). Curl et al (2009) observou que o tratamento com testosterona reverte a hipocontratilidade induzida pela orquidectomia, providenciando evidências do papel da testosterona na regulação do  $Ca^{2+}$ . Esta regulação pode ocorrer diretamente com elevação da concentração intracelular de  $Ca^{2+}$  e a atividade dos miofilamentos nos cardiomiócitos aumentando a contratilidade cardíaca.

#### 5.4 EFEITO DOS TRATAMENTOS NA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS SERCA2A, FOSFOLAMBAM E DA INTENSIDADE DA P-FOSFOLAMBAM(SER16), ENVOLVIDAS NA DINÂMICA DO $Ca^{2+}$ INTRACELULAR.

A fim de obter melhor compreensão dos dados de contratilidade, realizamos a análise molecular da SERCA-2a, PLB e p-PLB(Ser16). Verificamos que a DECA aumenta a expressão da SERCA-2a e sua razão com o PLB, não altera a intensidade do PLB, entretanto aumenta a intensidade da p-PLB(Ser16) e sua razão com o PLB. O tratamento com enalapril impede o aumento verificado nas proteínas SERCA-2a e p-PLB(Ser16), todavia não altera o PLB.

Nossos dados corroboram com o estudo de Nascimento et al (2016), onde fêmeas tratadas com 20 mg/kg de DECA durante 4 semanas apresentaram aumento da SERCA-2a, PLB e p-PLB-Thr17, de forma semelhante Kemi et al. (2010) demonstra que o DECA aumenta a expressão de SERCA2a. Segundo Er et al. (2007) os hormônios sexuais são extremamente importantes na regulação da dinâmica do  $Ca^{2+}$  cardíaco, uma vez que demonstra em seu estudo que aplicações agudas de diidrotestosterona (100 nM) em cultura de miócitos

ventriculares de ratas promoveu uma redução acentuada na corrente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Interessantemente, os mesmos autores demonstram que o mesmo tratamento por 24 horas no modelo acima promove efeito contrário ao observado de forma aguda, aumentando a corrente de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Poucos são os estudos que visam associar SERCA-2a e EAA, todavia nota-se que existem controvérsias entre si e variações na metodologia. Cruz et al. (2017) demonstraram não haver diferença na SERCA-2a após tratamento crônico com propionato de testosterona 5mg/kg em ratos wistar jovens. Dalpiaz et al (2015) demonstraram que a castração de ratos espontaneamente hipertensos, machos e fêmeas não alterou a expressão proteica da SERCA-2a. Todavia, Witayavanitkul et al. (2013), após castrarem ratos verificaram redução na atividade da SERCA-2a e a reposição com testosterona reverteu o prejuízo na atividade desta proteína. Dados de Mederle et al (2016), apresentaram o SRA, mais especificamente os receptores de angiotensina II como estimuladores da SERCA-2a, o que contribui para o entendimento de nossos dados onde o tratamento com enalapril impede o aumento da contratilidade induzida pelo DECA.

Sabe-se que, em ratos, 92% do fluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  durante a excitação-contração cardíaca é regulado pela SERCA-2a. Esta bomba atua no retículo sarcoplasmático (RS) facilitando armazenamento de cálcio no interior do mesmo e é regulada pelo PLB (Bers, 2002). Durante a sístole, o potencial de ação induz a liberação de cálcio do RS e, quanto maior a disponibilidade de cálcio, maior a contratilidade. Durante a diástole, o SERCA-2a aumenta o bombeamento de cálcio para o interior do RS, aumentando a eficiência do relaxamento (Frank, 2003).

O PLB é uma proteína integrada a membrana do RS, que regula a atividade da SERCA-2a. Quando fosforilado, o PLB é inativado resultando em maior atividade da SERCA-2a e conseqüentemente no aumento da captação de cálcio pelo RS, contribuindo para a facilitação do relaxamento e da contratilidade (Tada et al., 1982, Verboomen et al., 1992). Um aumento na relação SERCA-2a/PLB é um indicativo importante do aumento da atividade de SERCA-2a (Kemi, 2010). Desta forma, o aumento da razão SERCA-2a/PLB e da fosforilação do PLB em nossos animais, pode em parte justificar o aumento da contratilidade observada.



## 6 CONCLUSÃO

Nossos dados demonstram que o decanoato de nandrolona em ratos SHR, por um período de quatro semanas, foi capaz de acentuar a hipertrofia cardíaca e a pressão arterial e aumentar a contratilidade e relaxamento do ventrículo esquerdo, provavelmente por alterar proteínas responsáveis pela regulação de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (SERCA-2a, PLB e p-PLB-Ser16). A hipertrofia causada pela DECA pode ser considerada uma condição patológica, uma vez que encontra-se associada ao aumento de colégeno. Certamente, esta avaliação comparando o uso de EAA e a contratilidade cardíaca deve ser posteriormente investigada, especialmente com a exposição mais prolongada, visto que as exacerbações prolongadas desses efeitos podem desencadear complicações cardíacas. O tratamento anti-hipertensivo com o enalapril e na forma de monoterapia, apesar de reduzir parcialmente a pressão arterial, foi capaz de impedir em animais SHR as alterações ocasionadas pelo DECA, demonstrando o importante papel do SRA nas alterações ocasionadas por esse EAA.

## 7 REFERÊNCIAS

ALFREDO, M; ENRIQUE, H. Spontaneously Hypertensive Rats a Potential Model to Identify Drugs for Treatment of Learning Disorders. **Hypertension**. v. 31, p. 968-972, 1998.

ANDRADE, T. U. et al. Effect of enalapril treatment on the sensitivity of cardiopulmonary reflexes in rats with myocardial infarction. **ClinExpPharmacolPhysiol**, v. 34, p. 606-611, 2007.

ANDRADE, T. U. et al. Higher physiological doses of nandrolonedecanoate do not influence the Bezold-Jarish reflex control of bradycardia. **Arch Med Res**, v. 39, p. 27-32, 2008.

ANDRADE T.U et al. Role of the renin-angiotensin system in the nandrolone decanoate induced attenuation of the Bezold-Jarisch reflex. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**. 2011; v. 89, p. 891-897.

BAHRKE, M. S.; YESALIS, C. E. Abuse of anabolic andro-genic steroids and related substances in sport and exercise. **CurrOpinPharmacol**, v. 4, p. 614-620, 2004.

BAUMAN, D. E. C. J. et al. Effect of bovine somatotropin on metabolism of lactating dairy cows: Influence on rates of irreversible loss and oxidation of glucose and nonesterified fatty acids. **J. Nutr**, v. 118, p. 1031-1040, 1988..

BERS, D. M. Calciumfluxesinvolved in controlofcardiacmyocytecontraction. **CircRes**, v. 87, p. 257-281, 2000.

BERS, D. M. Cardiac excitation-contraction coupling. **Nature**, v. 415, p. 198-205, 2002.

BEUTEL, A. et al. Effects of chronic anabolic steroid treatment on tonic and reflex cardiovascular control in male rats. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**. v.93, n.1, p.43-48, 2005.

BISSOLI, N. S. et al. Captopril prevents ventricular hypertrophy in sinoaortic denevated rats. **Braz J Med Biol Res**. v. 24, p. 191-194, 1991.

BISSOLI, N. S. et al. Long-term treatment with supraphysiological doses of nandrolonedecanoate reduces the sensitivity of Bezold-Jarisch reflex control of heart rate and blood pressure. **Pharmacol Res**, v. 59, p. 379-84, 2009.

BRILLA C. G; ZHOU G; MATSUBARA L, et al. Collagen metabolism in cultured adult rat cardiac fibroblasts: response to angiotensin II and aldosterone. **J Mol Cell Cardiol**, v. 26, p. 809—20, 1994.

BUTENANDT A; HANISCH G. Über die Umwandlung des Dehydro-androsterons in  $\Delta^4$ -Androsten-ol-(17)-On-(3) (Testosteron); ein Weg zur Darstellung des

Testosterons aus Cholesterin (Vorläuf. Mitteil.). **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)**, 68(9), pp.1859–1862, 1935.

CAFRI, G. et al. Pursuit of the muscular ideal: physical and psychological consequences and putative risk factors. **ClinPsychol Rev**, v. 25, p. 215-239, 2005.

CALFEE R; FADALE P. Popular ergogenic drugs and supplements in young athletes. **Pediatrics**, v. 117(3), p.577-89, 2006.

CALIMAN, I. F et al. Long-term treatment with Nandrolone Decanoate impairs mesenteric vascular relaxation in both sedentary and exercised female rats. **Steroids**. v. 120, p. 7–18, April 2017.

CAMPBELL, S. E; FARB, A; WEBER, K. T. Pathologic remodeling of the myocardium in a weightlifter taking anabolic steroids. **Blood Press**. v. 2, n. 3, p. 213-216, 1993.

CELOTTI, F.; CESI, P. N. Anabolic steroids: a review of their effects on the muscle, of their possible mechanisms of action and of their use in athletics. **J. SteroidBiochem Mol Biol**, v. 43, p. 469-477, 1992.

COSTEROUSSÉ O, et al. Angiotensin converting enzyme (kininase II). **Molecular and physiological aspects**. v.86(6), p.586–98, 1992.

CREUTZBERG, E.C, SCHOLS A.M. Anabolic steroids. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 2(3), p. 243-53, 1999.

CRUZ, S. F. A et al. Administration of anabolic steroid during adolescence induces long-term cardiac hypertrophy and increases susceptibility to ischemia/reperfusion injury in adult Wistar rats. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 960-0760(17), p. 300-12, 2017.

CUNHA, T. S. et al. Esteroides anabólicos androgênicos e sua relação com a prática desportiva. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 40, n.2, p.165-179, abr./jun. 2004.

CURL, C. L. et al. Testosterone modulates cardiomyocyte Ca(2+) handling and contractile function. **Physiol Res**. v. 58, n. 2, p. 293-297, 2009.

CZEPIELEWSKI, M. A. et al. Esteróides anabolizantes no esporte. **RevBrasMed Esporte**, v. 8, n. 6, Nov/Dez, 2002.

DALPIAZ, P.L.M. et al. The chronic blockade of angiotensin I-converting enzyme eliminates the sex differences of serum cytokine levels of spontaneously hypertensive rats. **Brazilian journal of medical and biological research**, 46(2), pp.171–7, 2013.

DALPIAZ, P. L. M., et al. Sex Hormones Promote Opposite Effects on ACE and ACE2 Activity, Hypertrophy and Cardiac Contractility in Spontaneously Hypertensive Rats. **PLoS ONE**. p. 1-15, 2015.

DALPIAZ, P. L. M. Dimorfismo Sexual na Hipertrofia Ventricular Esquerda e Função cardíaca de Ratos Espontaneamente Hipertensos: O Papel da Atividade da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) e ECA2 no Ventrículo Esquerdo e no Rim. 2015. **Tese de doutorado**. PPGCF/UFES, Vitória, 2015.

DAVID, K et al. Über krystallinisches männliches Hormon aus Hoden (Testosteron), wirksamer als aus Harn oder aus Cholesterin bereitetes Androsteron. Der Schriftleitung zugegangen AM, 27. Mai 1935.

DE MEY, S. et al . Assessment of the time constant of relaxation: insights from simulations and hemodynamic measurements. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 280(6), p. 2936-43, 2001.

DIRIX A. Doping and doping control. In: Dirix A. Olympic book of sports medicine. New Jersey: **Blackwell**, p.655-80, 1988.

DZAU VJ, BURT D, PRATT R. Molecular Biology of the Renin-Angiotensin System. **Am J Physiol**. v.255(1), p.563–73, 1988.

EBENBICHLER, C. F. et al. Flow-mediated, endothelium-dependent vasodilatation is impaired in male body builders taking anabolic-androgenic steroids. **Atherosclerosis**, v. 158(2), p. 483-90, 2001.

ER, F. et al. Impact of testosterone on cardiac L-type calcium channels and Ca<sup>2+</sup> sparks: acute actions antagonize chronic effects. **Cell Calcium**, v. 41(5), p. 467-77, 2007.

EVANS, N. A. Current concepts in anabolic-andro-genic steroids. **Am J Sports Med**, v. 25, p. 534-542, 2004.

FABIATO, A. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 245, n. 1, p. 1-14, 1983.

FALANGA, V. et al. Stimulation of collagen synthesis by the anabolic steroid stanozolol. **J Invest Dermatol**. v. 111, p. 11193-1197, 1998.

FALKENSTEIN, E. et al. Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects. **Pharmacological reviews**, v.52(4), p.513–556, 2000.

FERMO, R. S et al. Efeito da suplementação alimentar sobre ação anabólica do decanoato de nandrolona em ratos. **Rev. Eletrônica Farm.** v. 5(1), p. 111-21, 2008.

FINESCHI, V. et al. Anabolic steroid abuse and cardiac sudden death: a pathologic study. **Arch Pathol Lab Med**, v. 125, p. 253-255, 2001.

FORTUNATO, R. S. et al. Chronic administration of anabolic androgenic steroid alters murine thyroid function. **Med Sci Sports Exerc.** v. 38, n.2, p. 256-261, 2006.

Frank K.F., Bölck B., Erdmann E., Schwinger R.H.G. Sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase modulates cardiac contraction and relaxation. **Cardiovascular Research**, v. 57: p. 20–27, 2003.

FRANQUNI, J.V.M. et al. Nandrolone decanoate determines cardiac remodelling and injury by an imbalance in cardiac inflammatory cytokines and ACE activity, blunting of the Bezold-Jarisch reflex, resulting in the development of hypertension. **Steroids**, v. 78(3), p.379–385, 2013.

FRANK, K. F. Sarcoplasmic reticulum Ca ATPase modulates cardiac contraction and relaxation. **Cardiovasc Res**, v. 57, p. 20-27, 2003.

GRIVETTI, L.E; APPLGATE, E. A. From Olympia to Atlanta: a cultural historical perspective on diet and athletic training. **J Nutrition**, v. 127, p. 860-8, 1997.

GROSSELLI, M. Esteroides Anabolizantes e os efeitos adversos sobre o sistema cardiovascular: **Uma Revisão Bibliográfica**. Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC Centro de Ciências da Saúde e do Esporte. Florianópolis, 2009.

HARTGENS, F.; KUIPERS, H. Effects of androgenic-anabolic steroids in athletes. **Sports Med**, v. 34, n. 8, p. 513-554, 2004.

HASSAN, A. F; KAMAL, M. M. Effect of exercise training and anabolic androgenic steroids on hemodynamics, glycogen content, angiogenesis and apoptosis of cardiac muscle in adult male rats. **Int J Health Sci (Qassim)**. v. 7, n. 1, p. 47-60, Jan. 2013.

HEBERT A, HAUPT MD, GEORGE D, ROVERE M. Anabolic steroids: a review of the literature. **Am J Sports Med**, v. 12(6), p. 469-84, 1984.

HOBERMAN, J.M; YESALIS, C.E. The history of synthetic testosterone. **Scientific American**, v. 272(2), p.76–81, 1995.

HO CK, HABIB FK. Estrogen and androgen signaling in the pathogenesis of BPH. **Nat Rev Urol**, v. 8(1), p. 29-41, 2011.

HUXLEY, H.; HANSON, J. Changes in the cross striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. **Nature**, v. 22, p. 973-976, 1954.

ICHIHARA S. et al. Angiotensin II type 2 receptor is essential for left ventricular hypertrophy and cardiac fibrosis in chronic angiotensin II-induced hypertension. **Circulation**, v. 104, p. 346-51, 2001.

JALIL, J. E. et al. Fibrillar collagen and myocardial stiffness in the intact hypertrophied rat left ventricle. **Circ Res**, v. 64(6), p. 1041-50, 1989.

JANSSEN, P. J., et al. Immunohistochemical detection of the androgen receptor with monoclonal antibody F39.4 in routinely processed, paraffin-embedded human tissues after microwave pre-treatment. **J HistochemCytochem**, v. 42(8)p. 1169-75, 1994.

JOHN B; JOSEPH B; MICHAEL B. W. Fisiologia National Medical Series. 3ª Ed. **Guanabara Koogan**. p. 162-174, 1995.

KANAYAMA, G.; POPE, H. G.; HUDSON, J. I. Body image drugs: a growing psychosomatic problem. **Psycho-therPsychosom**, v. 10, p. 61-65, 2001.

KANAYAMA, G. et al. Risk factors for anabolic-androgenic steroid use among weightlifters: a case-control study. **Drug Alcohol Depend**, v. 71, p. 77-86, 2003.

KANG, N.N et al. Testosterone improves cardiac function and alters angiotensin II receptors in isoproterenol-induced heart failure. **Clinical Research**. v. 105, p. 68-76, 2012.

KATZ, A. M. Contractile proteins of the heart. **Physiol Rev**, v. 50, p. 63-158, 1970.

KEMI, O. J; WISLOFF, U. Mechanisms of exercise-induced improvements in the contractile apparatus of the mammalian myocardium. **Acta Physiol**, v. 199(4), p. 425-43, 2010.

KENNEDY, M. C.; LAWRENCE, C. Anabolic steroid abuse and cardiac death. **Med J Aust**, v. 158, p. 346-348, 1993.

KICMAN, AT. Pharmacology of anabolic steroids. **Br J Pharmacol**. V. 154, n. 3, p. 502-521, 2008.

KNOBIL E, NEILL J. The physiology of reproduction. New York: **Raven Press**, p.975-98, 1988.

KOBAYASHI T; SOLARO RJ (2005). Calcium, thin filaments, and the integrative biology of cardiac contractility. **Annu Rev Physiol**, v. 67, p. 39-67, 1991.

KOCHAKIAN CD, YESALIS CE. Anabolic-androgenic steroids: A historical perspective and definition. In: Yesalis CE. Anabolic steroids in sports and exercise. 2a ed. Champaing: **Kinetic Humans**, cap.1, p.17-50, 2000.

KOCHAKIAN, C. D; WELBER, A. A. Anabolic-androgenic steroids: in cell culture. **Vitro cellular & developmental biology**, Columbia, v. 29A, n. 6, p. 433-438, 1993.

KUIPERS H. et al . Influence of anabolic steroids on body composition, blood pressure, lipid profile and liver functions in body builders. **Int J Sports Med**, v. 12(4), p. 413-8, 1991.

LEHMAN, W; CRAIG, R. Tropomyosin and the steric mechanism of muscle regulation. **Adv Exp Med Biol**, v. 644, p. 95-109, 2008.

LEHMAN W, GALINSKA-RAKOCZY A, HATCH V, TOBACMAN LS; CRAIG R. Structural Basis for the Activation of Muscle Contraction by Troponin and Tropomyosin. **J Mol Biol**, v. 634, p. 95-100, 2009.

LEITE, M. A.F; GILLEBERT, T.C. Nonuniform course of left ventricular pressure fall and its regulation by load and contractile state. **Circulation**, v. 90, p. 2481-249, 1994.

LIMA E.M. et al. Cardiopulmonary reflex, cardiac cytokines, and nandrolone decanoate: response to resistance training in rats. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 93(11), p. 985-91, 2015.

LIU, P. Y.; DEATH, A. K.; HANDELSMAN, D. J. Androgens and cardiovascular disease. **Endocrine Reviews**, v. 24, p. 313-340, 2003.

LIZARDO, J. H. Post resistance exercise hypotension in spontaneously hypertensive rats is mediated by nitric oxide. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 35, p. 782-787, 2008.

LIZARDO, J. H. F. Efeitos de uma única sessão de exercício resistido na contratilidade miocárdica e na reatividade vascular de ratos espontaneamente hipertensos. 2008. Tese de doutorado. PPGCF/UFES, Vitória, 2007.

LOIOLA, L. Z. Enalapril previne alterações cardiovasculares promovidas pelo tratamento crônico com doses suprafisiológicas de decanoato de nandrolona em ratos sedentários. **Dissertação de mestrado**. PPGCF/UFES, Vitória, 2011.

LORELL B.H. Significance of diastolic dysfunction of the heart. **Annu. Rev. Med.** v. 42, p. 411-436, 1991.

LOSEL, R; WEHLING, M. Nongenomic actions of steroid hormones. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 4, p. 46–55, 2003.

MACHADO, A. G; RIBEIRO, P. C. P. Anabolizantes e seus riscos. **Adolescência & Saúde**. v. 1. Dez. 2004.

MADY, C et al. Relation between interstitial myocardial collagen and the degree of clinical impairment in Chagas' disease. **American Journal of Cardiology**, v. 84(3), p. 354-6, 1999.

MERDELE, K., et al. The angiotensin receptor-associated protein Atrapis a stimulator of the cardiac Ca<sup>2+</sup>-ATPase SERCA2a. **Cardiovascular Research**. v. 110, p. 359–370, 2016.

MARINHO, R.B. et al. Alterações histológicas promovidas pelo uso de esteróides anabólicos androgênicos (decanoato de nandrolona) em ratos. **Scientia**. Espírito Santo, v.7, n.1/2, p. 89-109, jan/dez, 2006.

MARSH, J. D. et al. Androgen receptors mediate cardiac hypertrophy in cardiac myocytes. **Circulation**. v. 98, p. 256-261, 1998.

MAUGHAN D. W. Kinetics and energetics of the crossbridge cycle. **Heart Fail Ver**, v. 10, p. 175-185, 2005.

MELCHERT, R. B.; WELDER, A. A.; Cardiovascular effects of androgenic-anabolic steroids. **Medicine Science of Sports Exercise**, Madison, v. 27, p. 1252-1262, 1995.

MOORADIAN, A. D, MORLEY J. E, KORENMAN S. G. Biological actions of androgens. **Endocr Ver**, v. 8, p.1–28, 1987.

MORIMOTO, S. Sarcomeric proteins and inherited cardiomyopathies. **Cardiovasc Res**, v.77, p.659-666, 2008.

MACHADO, A. G.; RIBEIRO, P. C. P. Anabolizantes e seus riscos. Vol. 1. Dez. 2004.

MEDEI, E. et al. Chronic treatment with anabolic steroids induces ventricular repolarization disturbances: Cellular, ionic and molecular mechanism. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v.49(2), p.165–175, 2010.

MELNIK, B.; JANSEN, T.; GRABBE, S. Abuse of anabolic-androgenic steroids and bodybuilding acne: an underestimated health problem. **J DtschDermatolGes**, v. 5, p. 107-110, 2007.

MENESES, A.; HONG, E. Spontaneously Hypertensive Rats : A Potential Model to Identify Drugs for Treatment of Learning Disorders. **Hypertension**, v. 31, p. 968-972, 1998.

Min L; Mark E. A. Ca<sup>2+</sup> Cycling in Heart Failure. **Circ Res**. v. 113(6): p. 690–708. 2013.

MOSS, R. L.; RAZUMOVA, M.; FITZSIMONS, D.P. Myosin crossbridge activation of cardiac thin filaments: implications for myocardial function in health and disease. **CircRes**, v. 94, p.1290-1300, 2004.

NAKAYAMA Y. et al.. Functional and histopathologic correlation in patients with dilated cardiomyopathy: an integrated evaluation by multivariate analysis. **J Am Coll Cardiol**, v. 10(1), p. 186-92, 1987.



NASCIMENTO, A. et al. Testosterone induces apoptosis in cardiomyocytes by increasing proapoptotic signaling involving tumor necrosis factor- $\alpha$  and renin angiotensin system. **Human & Experimental Toxicology**, v.34(11), p.1–9, 2015.

NASCIMENTO, A.M. do et al. SERCA2a and Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger are involved in left ventricular function following cardiac remodelling of female rats treated with anabolic androgenic steroid. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 301, p.22–30, 2016.

NICHOLSON, T.M; RICKE, W. A. Androgens and estrogens in benign prostatic hyperplasia: Past, present and future. **Differentiation**, v. 82(4-5), p.184-99, 2011.

NGUYEN, Q. C et al. Discordance in National Estimates of Hypertension Among Young Adults. **Epidemiology**, v. 22, p. 532–541, 2011.

ONAKOMAIYA, M. M.; HENDERSON, L.P. Mad men, women and steroid cocktails: a review of the impact of sex and other factors on anabolic androgenic steroids effects on affective behaviors. **Psychopharmacology**, 233(4), pp.549–69, 2016.

PARSONS, J. K. et al. Serum testosterone and the risk of prostate cancer: potential implications for testosterone therapy. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. v. 14, n. 9, p.2257-2260, 2005.

PENNA, C. et al. Nandrolone-pretreatment enhances cardiac  $\beta_2$ -adrenoceptorexpression and reverses heart contractile down-regulationin the post-stress period of acute-stressed rats.**Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**.v. 107, P.106–113, 2007.

PHILLIS, B. D et al. Combined cardiac effects of cocaine and the anabolic steroid, nandrolone, in the rat. **European Journal ofPharmacology**, v. 398, p. 263–272, 2000.

RIVIÈRE G, et al. Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2) and ACE Activities Display Tissue-Specific Sensitivity to Undernutrition-Programmed Hypertension in The Adult Rat. **Hypertension**. v.46(5), p.1169–74, 2005.

ROCHA, F. L.; ROQUE, F. R.; OLIVEIRA, E. M.Anabolic steroids induce cardiac renin-angiotensin system and impair the beneficial effects of aerobic training in rats.**Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 293, p. 3575–3583, 2007.

RUZICKA, L.;WETTSTEIN, A. Sexualhormone VII. Über die künstliche Herstellung des Testikelhormons Testosteron (Androsten-3-on-17-ol). **Helvetica Chimica Acta**, 18(1), pp.1264–1275. 1935.

SANJULIANI, A. F et al. Eixo Renina - Angiotensina - Aldosterona: Bases Fisiológicas e Fisiopatológicas. **Rev do Hosp Univ Pedro Ernesto**, UERJ. v. 10(3), p. 20–30, 2011.

SHAHIDI, N. T. A Review of the Chemistry, Biological Action, and Clinical Applications of Anabolic-Androgenic Steroids. **ClinTherap**, v. 23, n.9, p. 1355-1390, 2001.

SHIRWANY A, WEBER KT. Extracellular matrix remodeling in hypertensive heart disease. **J Am Coll Cardiol**, v. 48(1), p. 97-8, 2006.

SOLARO, R. J.; RARICK, H. M. Troponin and Tropomyosin: Proteins That Switch on and Tune in the Activity of cardiac myofilaments. **Circ Res**, v. 83, p. 471-480, 1998.

SULLIVAN, M.L.; MARTINEZ, C.M.; GENNIS, P.; GALLAGHER, E.J. The cardiac toxicity of anabolic steroids. **ProgCardiovasc Dis**, v. 41, p. 1-15, 1998.

TADA, M; KATZ, A. M. Phosphorylation of the sarcoplasmic reticulum and sarcolemma. **Annu Rev Physiol**, v. 44, p. 401-423, 1982.

TAKAHASHI, M; TATSUGI, Y; KOHNO, T. Endocrinological and pathological effects of anabolic-androgenic steroid in male rats. **Endocr J**. v. 51, n. 4, p. 425-434, 2004.

TANNO et al. Nandrolone and resistance training induce heart remodeling: Role of fetal genes and implications for cardiac pathophysiology. **Life Sciences**. v.89, p. 631–637, 2011.

THOMAS, C. J; HEAD, G. A; WOODS, R. L. ANP and bradycardic reflexes in hypertensive rats: influence of cardiac hypertrophy. **Hypertension**. v. 32, p. 548-555, 1998.

UGGERE, T. A. et al. The cardiopulmonary reflexes of spontaneously hypertensive rats are normalized after regression of left ventricular hypertrophy and hypertension. **Braz J Med Biol Res**. v. 33, p. 589-594, 2000.

VELASCO, I. et al. Intracellular cAMP increases during the positive inotropism induced by androgens in isolated left atrium of rat. **European journal of pharmacology**, Amsterdam, v. 438, p. 45-52, 2002.

VENÂNCIO, D. P. et al. Avaliação descritiva sobre o uso de esteroides anabolizantes e seu efeito sobre as variáveis bioquímicas e neuroendócrinas em indivíduos que praticam exercício resistido. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte** .v. 16, n. 3, p.191-195, 2010.

VERBOOMEN, H., et al. Functional difference between SERCA2a and SERCA2b Ca<sup>2+</sup> pumps and their modulation by phospholamban. **Biochem J**, v. 286 ( Pt 2), p. 591-5, 1992.

VERMA, A; SOLOMON, S.D. Diastolic dysfunction as a link between hypertension and heart failure. **Med.Clin.North Am**, v. 93, p. 647-664, 2009.

XU, L.; MEISSNER, G. Mechanism of Calmodulin Inhibition of Cardiac Sarcoplasmic Reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  Release Channel (Ryanodine Receptor). **Biophysical Journal**, v. 86, p. 797-804, 2004.

WAGNER, M; MORITZ, A; VOLK, T. Interaction of gonadal steroids and the glucocorticoid corticosterone in the regulation of the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current in rat left ventricular cardiomyocytes. **Acta Physiol.** v.202, p. 629–640, 2011.

WIER, W. G.; BEUKELMANN, D. J. Sodium calcium exchange heart: current voltage relation and intracellular concentration. **Mol Cell Biochem**, v. 89, p. 97-102, 1989.

WILSON J. D, GRIFFIN J. E, GEORGE F. W, LESHIN M. The role of gonadal steroids in sexual differentiation. **Recent Prog Horm Res** v. 37, p.1–39, 1981.

WITAYAVANITKUL, N. et al. Testosterone regulates cardiac contractile activation by modulating SERCA but not NCX activity. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** v. 304, n. 3, p. 629-640, 2013.

WORLD ANTI DOPING AGENCY. Prohibited list 2010. 1 jan. 2010. Disponível em: [https://www.wadaama.org/sites/default/files/resources/files/WADA\\_Prohibited\\_LisL\\_2010\\_EN.pdf](https://www.wadaama.org/sites/default/files/resources/files/WADA_Prohibited_LisL_2010_EN.pdf); Acesso em: maio 2017.

YANG, D. et al. Calmodulin regulation of excitation-contraction coupling in cardiac myocytes. **Circulation research**, v. 92, n. 6, p. 659-667, 2003.

YOKOYAMA, T. et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  provokes hypertrophic growth response in adult cardiac myocytes. **Circulation**, Dallas, v. 95, n. 5, p. 1247-1252, 1997.

YANO, M.; IKEDA, Y.; MATSUZAKI, M. Altered intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  handling in heart failure. **J Clin Invest**, v. 115, p. 556-564, 2005.

ZHANG, T.; MIYAMOTO, S.; BROWN, J. H. Cardiomyocyte Calcium and Calcium/Calmodulin dependent Protein Kinase II: Friends or Foes?. **Recent Progress in Hormone Research**, v. 54, p. 141-168, 2004.